CURSUSSEN
GEDOCEERD AAN DE
UNIVERSITEIT TE GENT
BEZORGD DOOR
N. V. STANDAARD-BOEKHANDEL

REEKS
NATUUR- EN GENEESKUNDIGE WETENSCHAPPEN

Prof. Dr. R. RUYSSEN

BIOLOGISCHE GENEESMIDDELEN

PROTEINEN - FERMENTEN - VITAMINEN - HORMONEN

DEEL II

GENT
1945

543.4
R94b
v.2

D E V I T A M I N E N

Algemeenheden :

Het zijn typische biocatalysatoren, werkstoffen of regulatoren in het microheterogeen biologisch milieu, meestal van plantaardigen oorsprong. Voor den mensch zijn ze een soms dagelijksche behoefte, daar ze niet in het organisme zelf gesynthetiseerd worden. Ze worden met het voedsel opgenomen en het physiologisch probleem sluit aan bij het voedingsprobleem. Talrijke zijn nu reeds de medische toepassingen.

De kennis van de vitaminen heeft in de loop van de laatste jaren een uiterst snelle ontwikkeling doorgemaakt. Ieder jaar komen nieuwe feiten voor den dag, krijgen de voedingsfactoren een beter toegelichte beteekenis. Ze worden niet alleen gebruikt voor de genezing van soms zeldzame difficiëntieziekten, maar zijn zelf van fundamenteel belang in de stofwisseling, de weefselademhaling, de bouw van epithelium en bindweefsels, de werking der fermenten, waarvan ze soms de belangrijkste bouwsteen zijn; in synergisme of antagonisme met hormonen ook als regulatoren van de belangrijkste physiologische functies.

Korte historiek der Vitaminenleer :

1. Sedert eeuwen was bekend dat bij lange zeereizen of veldtochten met gebrekkige voedingsvoorwaarden en geen versch voedsel, een zeer gevaarlijke ziekte optrad, de scheurbuik. Die ziekte kon genezen worden met versch vleesch, vruchten of groenten.
Ter voorbehoeding raadde Cook, een Engelsch zeevaarder, aan citroensap te gebruiken. Het gebruik van uien door de Noormanne, was voor hen een hoofdfactor van goede conditie.

In het midden van de negentiende eeuw, na de proeven van Lavoisier, meende men dat het voedsel in de eerste plaats als brandstof moest dienen, om aan het organisme de noodige energie (calori-

sche) te geven. Bovendien moest het ook voorzien in de bouwstoffen voor het in stand houden van het lichaam, de opbouw van protoplasma, bloed, weefsel- en celbestanddeelen. De brandstof was geleverd door de koolhydraten en de vetten, wijl de proteïnen den cellenbouw bewerkten. Men had hierbij ook nog gevonden dat sporen van zware metalen een nuttige of onontbeerlijke rol te vervullen hadden (Cu, Zn, Fe, Mn, Ni, As, Co, Mg). Nochtans bleken weldra andere constituenten onontbeerlijk voor een gezonde voeding.

2. Forster (1873) bewees dat duiven en honden gevoed met zuivere koolhydraten eiwit en vet, binnen korten tijd stierven (zoutgebrek ?).
Lunin in Bazel toonde aan, dat hetzelfde dieet vermengd met melkasch slechts den dood vertraagde. Melkpoeder daarentegen kon de dieren maandenlang in leven houden. Hij concludeerde hieruit, dat buiten water, zout, koolhydraten, eiwit en vet, nog andere stoffen noodzakelijk zijn.

3. Takaki (1882) wees op het verband tusschen de in OostAzië verspreide beri-beri en de eenzijdige rijstvoeding. De gevallen van beri-beri verminderden zeer snel, wanneer in de Japansche marine de rijst door brood, vleesch, groenten en vruchten vervangen werd.

4. Het uitgangspunt van het vitamineonderzoek is de ontdekking van Eykman op Java, dat die hier zoo verspreide beri-beri veroorzaakt was door de eenzijdige voeding met geslepen rijst (korrel zonder zilvervliesje).

Statistieken der gevangenen :
op 150.226 gevallen van geslepen rijst waren 4201 gevallen van beriberi.
op 96530 gevallen van voeding met ongeslepen rijst slechts 9.
Ook bij kippen werd hetzelfde opgemerkt- en de beri-beri werd genezen door aan de gepolijste korrels de vliesjes of een extract ervan bij te voegen.

Voor de eerste maal werd een zoo getypeerde deficiëntieziekte, veroorzaakt door gebrek aan een afgezonderd bestanddeel, ontdekt.

De genezing, zoowel bij den mensch als bij de kip liet dan toe over een test te beschikken ter beoordeeling der vitaminewerkzaamheid.

5. Hopkins bewees de noodzakelijkheid van aromatische aminozuren in de eiwitstof bij de voeding van muizen. Bij gebrek hieraan gingen de dieren na twee weken te gronde. Was aan de grondvoedingsstof tryptophaan toegevoegd, dan was het leven verlengd; nochtans groeiden de dieren niet (ook ratten groeiden niet). Ze werden na langen tijd ziek en stierven ook. Daaruit kon worden besloten dat afgezien van een volwaardig eiwit, koolhydraten, vet, zouten, nog andere belangrijke, zij ook ongekende stoffen, noodig waren. Hopkins vermoedde dat rachitis en scheurbuik moesten worden toegeschreven aan gebrek aan de kleine hoeveelheden van die stoffen. Slechts veel later werd zijn baanbrekende zienswijze aangenomen.

6. Stepp (1909) kon waarnemen dat de kost ontoereikend is, wanneer de in alcohol en aether oplosbare bestanddeelen er uit geëxtraheerd waren. In 1911 zegde hij dat die stoffen tot de lipoïden behoorden; later werd ingezien dat het stoffen waren die in de lipoïden en de lipiden oplossen.

In tusschentijd was Hopkins er in gelukt zijn ratten in leven te houden door toevoeging van melk, waarvan de hoeveelheid te klein was om een belangrijke caloriën bijdrage te leveren.

Hölst en Frölich hadden kunstmatige scheurbuik verwezentlijkt bij caviae (niet bij andere dieren) door uitsluitend toedienen van gepelde rijst.

De benaming "vitamine" komt toe aan Funk en de deficiëntieziekte werd bestempeld als avitaminose. Hiertoe waren eerst gerekend scheurbuik en beri-beri; voor rachitis, spruw, pellagra en nog andere was er vermoeding.

8. Mac Collum en Davies bewezen met nauwkeurigheid in 1915 dat ratten bij kunstvoeding niet meer groeiden, al bleven ze in leven. Groei trad weer op door het toevoegen van een aetherisch tract uit ei en boter. Hopkins en Stepp toonden aan dat boter niet kon vervangen worden door olijfolie en katoenolie. De groeitoestand ging dikwijls gepaard met infectieuze oogziekten.

Funk onderscheidde de vetoplosbare groeifactor (A factor) van een in water oplosbare Bfactor (1914). Gebrek aan de in gist, tarwezemelen en rijst voorkomende B factor veroorzaakte beri-beri bij de duiven. Daaruit werd besloten dat die factor identisch is met de bij den mensch werkzame vitamine. Later werd ingezien dat ook in gist een ander groeifactor voor de ratten voorkomt (vitamine B_2 en B_4). De samenhang tusschen het gebrek aan vetoplosbare A factor en de als deficiëntie gekenmerkte oogziekte (xerophtalmie) werd in tusschentijd bevestigd.

In Japan werd de binnelandsche Japansche bevolking herhaaldelijk aangetast door wat men dacht epidemieën te zijn van oogbindvliesontsteking. Men stelde vast dat de kustvolkeren niet aangetast waren en genezing optrad door behandeling met levertraan.

9. In 1920 stelde Drummond voor de in vet oplosbare wasdom- en antixerophtalmische factor als vitamine A te bestempelen. De stof die behoedde tegen beri-beri en in water oplosbaar was werd vitamine B geheeten, en de tegen scheurbuikwerkzame : vitamine C. Om vergissing te voorkomen is het echter bij de talrijke nu bekende factoren, nuttig de letter te laten vergezellen van de naam : Vit.B_1 : aneurine; Vit C : ascorbinezuur.

10. Mellanby in 1918 kwam op het spoor van de oorzaak van rachitis. Jonge honden gevoed met een kost waarin vitamine B en C voorkwamen en lijdende aan de Engelsche ziekte konden hiervan genezen worden door toedienen van volle melk, boter en levertraan. Die stoffen konden ook de ziekte voorkomen. Mac Collum onderscheidde de deficiëntiefactor van de vitamine A, doordat ze niet onderhevig was aan oxydatie, hij noemde ze vitamine D. Het probleem bleek echter veel ingewikkelder. Rachitis kon genezen worden door het zonnelicht en ook door bestraling met ultra-violet licht. Ratten met vitamine D vrije kost kregen slechts rachitis in het donker, niet in het licht en de sterolen, niet alleen buiten het lichaam, maar ook in het lichaam, kan door werking van het licht op een provitamine de actieve vitamine gevormd worden.
Ook van vitamine A bestaat een provitamine : caroteen.

11. Von Euler en P.Karrer bevestigden dat de caroteen door veel dieren tot vitamine A omgezet wordt. Meer en meer kwam ook naar voren, dat de dieren verschillen in het vermogen vitaminen te synthetiseeren en dus wel of niet onderhevig zijn aan deficiëntieziekten. Tusschen het B complex had men weldra de factoren te onderscheiden, waarvan enkele slechts bij ratten, andere slechts bij duiven (B_3 en B_5) als groeifactoren werkzaam waren, ook dan volgde nog de vaststelling dat sommige werkstoffen slechts in combinatie werkzaam zijn, maar afzonderlijk niet.

Eindelijk werden de vitaminen als zuivere stoffen geïsoleerd. In 1926 B_1, in 1927 Ergosterol, in 1928 vitamine C (later in 193[illegible] bevestigd), in 193[illegible] vitamine A, in 1934 vit. B_2 lactoflavine; e[illegible]delijk in de laatste j[illegible]en, de meeste nog ontdekte factoren : vit. E of tocopherol, vit.K, nicotinezuuramide, vitamine B_6 of pyridoxine, pantotheenzuur,

Naarmate de studie der vitaminen als zuivere stoffen de mogelijkheid heeft geboden quantitatieve methoden van bepaling en onderzoek uit te werken, hebben zich dan nog andere problemen gesteld. Zoo bijv. het synergisme en antagonisme der vitaminen onderling en der vitaminen tegenover de hormonen. Als bouwsteen van belangrijke fermentsystemen (vit. B_1 = carboxylase, nicotinezuuramide = codehydrasen), nemen ze eveneens in de weefselademhaling een zeer belangrijke plaats in. De vitaminenleer heeft echter vooral de voedingsproblemen als hoofddoel. Vast te stellen bijv. hoe de vitaminebehoeften van den aard, maar ook van de verhouding en de hoeveelheid der voedingsstoffen afhangen. Voor aneurine werd vastgesteld dat het verbruik des te meer toeneemt dat meer koolhydraat wordt toegediend. Met een zelfde toediening van vit.B_1 kan door verhooging van koolhydratengehalte een B_1 hypo of avitaminose ontstaan. Waar[illegible] is dan verder de vitaminebehoefte zoo verscheiden voor mensch en dier ? Is er tusschen die behoefte en de gewone voeding een verband ? Men zou zeggen, dat een dier deficiëntie-verschijnselen laat bli[illegible] wanneer tusschen de bestanddeelen van de normale voeding een sto[illegible] ontbreekt. Bijv. groenetende dieren en bijz. caviae zijn zeer gev[illegible]

lig aan vitamine C gebrek; de koornetende vogel aan B_1 die ze overvloedig met dat voedsel verkrijgt en de mensch met een gemengde voeding, is aan alle vitaminen gevoelig. Door langdurige toediening van vit. C aan ratten kunnen ze vit. C gevoelig worden (zonder daarom het synthetiseerend vermogen te verliezen. De hypothesen in die richting zijn nochtans nog te bevestigen. Wat men ook zegge ten voordeele van het gebruik van gesynthetiseerde zuivere vitaminen, het blijkt ontegensprekelijk veel gunstiger de verschillende voedingsfactoren te betrekken onder de vorm van een volledig en afgewisseld dieet.

Definitie van het begrip Vitamine :

Het is een geringe hoeveelheid werkzame organische stof die in het normaal voedsel moet voorkomen, en voor groei en behoud van het dierlijk organisme onontbeerlijk is. Verwaarloosbaar is haar functie als caloriënleverende stof of als bouwmateriaal. Tegenwoordig is een onderscheid tusschen vitamine en hormoon moeilijk. Vitaminen worden niet gesynthetiseerd in het organisme of bij hun vorming moeten onwerkzame exogene stoffen worden gebruikt (maar thyroxine synthese vergt toevoer van Jodium) Het grootste deel der synthese van Vit. D_3, de hydrocholesterol treedt op in het dierlijk organisme, een bestraling is daarna voldoende. Vit.C zou bij de meeste dieren als hormoon werken, bij andere als vitamine.

Karakteristiek is het voor de drie werkstoffen dat fermenten vooral als catalysatoren werken - hormonen worden speciaal in het organisme gesynthetiseerd - vitaminen moeten van buiten worden toegediend, zijn een voorstadium of buitenfactor -bestraling-.

De biologische Vitaminebepaling :

Eerst meende men een absolute ijking te kunnen doorvoeren; nu wordt vooral geijkt ten opzichte van internationale standaardpreparaat met bekend aantal eenheden. Om de werking vast te stellen moeten de ziekte ymptomen van bepaalde dieren nauwkeurig bekend zijn.

De deficiëntieziekten worden verkregen door de dieren te voeden met een dieet, dat alle noodige bestanddeelen bevat, en ook alle vitaminen, behalve de op te zoeken factor. Het voedsel moet daarom gezuiverd worden om het van deze vitaminen te bevrijden (verwarmd of geëxtraheerd). Soms voegt men andere zuivere vitaminen toe, om subclinische vreemde avitaminosen te verbinden. Het dierlijk organisme of de weefsels hebben steeds een reserve aan vitaminen; daarom moet de vitaminevrije voeding eerst gedurende een zekeren tijd doorgevoerd worden. De onderzoektest kan ofwel :

1. Therapeutisch of genezend zijn, ofwel
2. Prophylactisch.

Bij de genezende of curatieve test stelt men vast, welke dosis genezend werkt; bij de prophylactische test worden normale dieren met een vitaminevrij dieet en met verschillende dosen van de aan te toonen vitamine gevoed. Men bepaalt aan welke dose de ziekte voorkomen wordt. Controledieren worden zonder vitaminen gevoed, en moeten duidelijk de ziektesymptomen vertoonen (dieren van hetzelfde ras, gewicht, en zooveel mogelijk in gelijke voorwaarden gevoed en gekweekt.

De vitaminen worden ingedeeld in vetoplosbare en water-oplosbare vitaminen.

De vetoplosbare vitaminen zijn :

Vit. A of axerophtol; vit D_3 e.a.; vit. E of Tocopherol;

Vit K of Phyllochinon.

<u>Vitamine A. syn.axerophtol</u> :

De vitamine A factor werd eerst biologisch ontdekt. Ratten groeien goed met een synthetische dieet (caseïne, koolhydraat + aetherisch extract van ei of boter), ze groeien niet wanner de vetstof spek of olijfolie is.

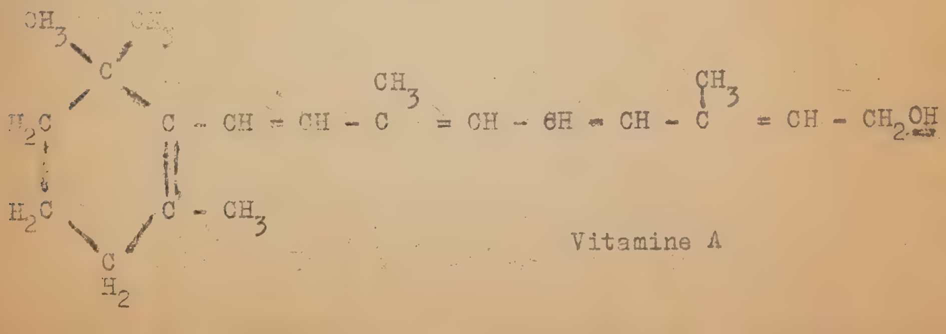
Groeistilstand gaat gepaard met oogziekten (bindvliesontsteking, nachtblindheid, xerophtalmie; bij de arme bevolking, vooral durende den oorlog van 1914, Denemarken. Hierbij werd vastgesteld dat de A factor voorkomt in boter (zomerboter), melk, eierdooier, nier, lever, visch, tomaten, wortels, groene groenten, levertraan (onver-

zeepbaar gedeelte). Het is in vetten-, maar niet in water oplosbaar, weerstaat betrekkelijk goed aan verhoogde temperatuur, maar wordt vernietigd door oxydatie, of door u.v.licht (langdurig schudden of verwarmen aan de lucht).

In 1925 vonden Rosenheim en Drummond dat vit A-houdende preparaten met $AsCl_3$ een blauwe verkleuring der oplossing doen ontstaan en ze gebruikten die reactie voor de colorimetrische bepaling. Carr en Price verbeterden deze belangrijke en bij het onderzoek onontbeerlijke test door gebruik van $SbCl_3$.

Verband tusschen vit. A en de gele kleurstof in de karotten en plantenextracten = carotenen (lipochromen). Steenbock bereidde kristallijne carotine, ook later P.Karrer en von Euler, die hiermede xerophtalmie genazen en een regelmatigen groei der ratten verkregen. In groene bladeren gaat de antixerophtalmische werking parallel met het chlorophylgehalte. Carotine bleek echter niet identisch met vit.A; de absorptieband van de blauwe kleur met $SbCl_3$ heeft zijn maximum bij 590 mμ ; voor vit.A was dit 610 mμ. In de laboratoria van Karrer werd carotine in drie isomeren (door chromatographische adsorptieanalyse) gesplitst : α, β en γ caroteen.
De β isomeer is bijna tweemaal zoo werkzaam als de twee andere en bijna zoo werkzaam als vit. A.

P.Karrer bewees dat een molecule β caroteen, symmetrisch opgebouwd is uit twee moleculendeelen, die op een atoom zuurstof na, identisch zijn met vit. A. Beide eindringen zijn β iononringen, terwijl α en γ carotenen slechts één dergelijken ring bevatten en door splitsing in de lever slechts een molecule axerophtol laten ontstaan (zie formulen).
De carotenen zijn de provitaminen A.



Vitamine A

Vitam. A werd zuiver bereid uit de traan van heilbot en makereel, die hieraan zeer rijk zijn. Het is een dikke olie, oplosbaar in organische oplosmiddelen, niet in water.

Zooals uit zijn chemische constitutie blijkt is het een niet verzadigde stof met vijf geconjegeerde dubbele bindingen (zie form.) een primaire alcoholfunctie en een β iononring.
Door de zuurstof der lucht wordt ze in zuivere vorm of in geconcentreerde oplossing geoxydeerd tot physiologisch onwerkzame verbindingen. De constitutiespecificiteit van vitamine A is immers zeer groot en geringe veranderingen in de chemische structuur voeren tot onwerkzame preparaten. Het smeltpunt van de zuivere vitamine A (8°), wordt steeds door de oxydatieproducten verlaagd.
In de natuur, bv. in levertraan, komt axerophtol zeer vaak als vetzuurester (palmitinezuur) voor. Onder die vorm is ze meer bestendig en physiologisch ook meer werkzaam.

Men heeft ontdekt dat in de lever van zoetwatervisschen een tweede vit.A., nl. vitamine A_2 voorkomt. Deze laatste heeft een gansch analoge chemische constitutie, bevat in het molecule twee koolstofatomen en waterstofatomen en een dubbele binding meer.
Het absorptiespectrum in het ultra-violet is ook iets verschillend (verschuiving van het maximum der absorptieband).
De physiologische werkzaamheid is dezelfde.

IJkingsmethoden :

a) Biologische methode.
De ratten worden gevoed met caseïne 12%, rijstzetmeel 76%, gist 8% (alle drie met alcohol geëxtraheerd), zoutenmengsel 4%, bestraalde ergosterol (vig. D_2). De dieren ondergaan slechts na enkele dagen deficiëntieverschijnselen, daar eerst de vit. A der lever verbruikt wordt. Na enkele weken houdt den groei op, men wacht nu nog . . week tot een duidelijk begin van gewichtsafval, en gaat dan het preparaat aan de verschillende diergroepen onder verschillende dosen toedienen. Als eenheid wordt de hoeveelheid genomen, die in dagelijksche dosis gedurende 5 weken een wekelijksche gewichtstoename van 3 g verwekt (en xerophtalmie geneest). Soms rekent men de minimale h.

veelheid, de gewichtsafval verhindert - 1 ratteenheid = ± 5 γ caroteen (van T.Moore).

De hoeveelheid, die een gemiddelde wekelijksche gewichtstoename van 3 gr. gedurende verschillende weken toelaat, stemt overeen met 1 Sherman eenheid.
In plaats van den groeitest wordt soms ook de kolpokeratose test gebruikt. Bij vit.A gebrek krijgen de vrouwelijke ratten een verhoorning van het slijmvlies van de scheede, en veel vroeger dan een groeistilstand. Men maakt hierbij gebruik van uitstrijkpreparaatjes van gecastreerde dieren.

De internationale eenheid is sinds 1934 0,6 γ zuivere β caroteen (m 1840) opgelost in kokosnootolie in een concentratie van 0,3 mg/g. I internationale eenheid = 2 mg. dezer oplossing.

b) Spectrophotometrische methode :
Vit. A is kleurloos, maar absorbeert het licht in het ultra-violet gebied met een maximum bij 328 mλ. Bij die golflengte bepaalt men de extinktiecoëfficient.
Daar de carotenen geel gekleurd zijn kan men ze eenvoudigst colorimetrisch bepalen, vergelijkende aan een waterige kalium bichromaat oplossing of een alcoholische azobenzoloplossing. Gekleurde verontreinigingen zooals chlorophylle of andere carotinoïden moeten vooraf verwijderd worden.

c) Chemische methode van Carr en Price.
Vit.A in chloroform opgelost geeft na menging aan een oplossing van antimoontrichloride een blauwe kleur. 2 cm^3 eener verzadigde oplossing van $SbCl_3$ in zuivere anhydrische chloroform (21-23%) wordt aan 0,2 eener 20 % oplossing der levertraan of het onverzeepbaar gedeelte toegevoegd en de optredende blauwkleuring wordt in de Lovibond tintometer snel gemeten (na 5 à 10 seconden) daar ze na enkele minuten snel verzwindt. De kleurintensiteit wordt gemeten door vergelijking van verschillende blauwglaasjes waarvan de waarden geaddeerd worden en het blauwgetal opleveren. In een gewone colorimeter kan men ook vergelijken aan bekende oplossingen van victoriablauw of kopersulfaat.

Die methode wordt vooral toegepast bij de standaardisatie van levertraan. Hiervan wordt dan iedermaal 0,020 g. gebruikt. Men verzeept die eerst met alcoholisch kaliloog (voorzorgen). β caroteen kleurt zich eveneens blauw door behandeling met $SbCl_3$, maar de intensiteit bedraagt slechts 1/20 van deze van vit. A.

Eenheden :

I. I.E. = 0,39 γ vit.A = 0,6 γ β caroteen
 I Shermaneenheid : 0,75 I.E.
 I.U.S.P. = 3 à 5 I.E.
 I C.L.O. = ± 6 I.E. (± 10 blauweenheden)
I I Lovibondeenheid : 6,4 I.E.
 I blauw E. = 0,58 I.E.

De officieele levertraan moet 600 I.E./g. bezitten.

Caroteenextractie uit planten of organen.

Het fijn gepoederd materiaal wordt met methanol en benzine uitgetrokken. De beide oplossingen worden samengevoegd en door water ontmengd waarbij α en β caroteen, lycopeen en xanthophylliëster in de benzinelaag overgaan. De xantophylleësters worden met alcoholische kaliloog verzeept en met methanol weggewasschen. α en β caroteen worden door adsorptieanalyse met kaolien en aluminiumoxyde van lycopeen gescheiden en tegen azobenzol gecolorimetreerd.

Voorkomen :

Vooral in vetrijke visch en dierlijke producten, lever, melk, en de hieruit gewonnen boter en kaas, nier, het netvlies van het oog. Het gehalte van de melk hangt af van den aard van het voedsel en het jaargetijde (zomer). Provitamine komt vooral in groenten voor (worteltjes, bloemkool, groene kool, tomaat, abrikoos).

Physiologische werking :

De menschelijke behoefte aan vit.A bedraagt 1-2 mgr.per dag (2500 à 5000 I.E.) en 3 à 6 mg. β caroteen.
De resorptie van axerophtol is aan de resorptie van de vetten in de darmmen gekoppeld. Het wordt in de lever opgestapeld. Hier worden de carotenen door carotinase in vit. A omgezet.

Bij den mensch is slechts 50% der peroraal aangevoerde β caroteen als vit. A werkzaam. Vit. A is bij uitstek de epitheelbeschuttende vitamine, onontbeerlijk voor den groei, de normale functie van huid en nethuid. Het duidelijkste verschijnsel bij vit. A gebrek is nachtblindheid (hemeralopie), gebrek aan gevoeligheid voor zwakke belichting. De opperhuid en slijmvliezen van de ademhalingsorganen spijsverteringsbuis, urogenitale organen vertoonen verkoorning en metaplasie. Er is een zeer verminderd weerstandsvermogen aan de bacteriën (anti-infectieuse vitamine). Vooral aan het oog is er verdroging en verhoorning aan de conjunctiva bulbi.

Therapeutische toepassingen.

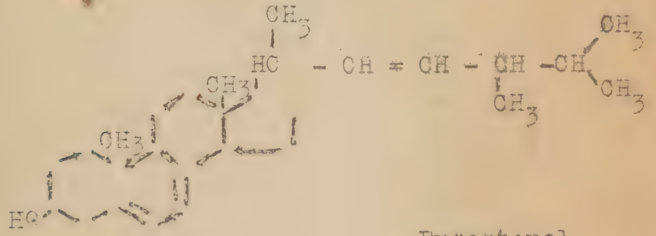
Bij hemeralopie, xerophtalmie, bij A hypovitaminose, slijmvliesaandoeningen van het spijverteringskanaal. Bij Basedowziekte (hyperthyroïdie) is er een veel hooger verbruik aan vitamine A, en de thyroxanevergiftiging wordt door vit. A verhinderd. Gunstige werking op het epithelium en de slijmvliezen bij infectieziekten (pneumonie, griep, asthma bronchiale, furonculose, stomatitis, dyspepsie, catarrhe der urinewegen. Toediening onder vorm van olieachtige oplossing, of levertraan zalf.

Vitamine D :

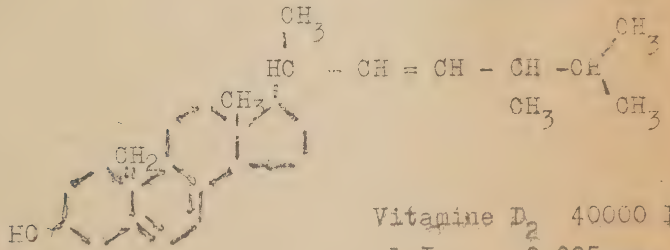
Reeds sedert 150 jaar was bekend dat levertraan rachitis of Engelsche ziekte geneest. Hopkins en Funk beschouwden dit als een deficiëntieziekte en dit werd bevestigd door Mellanby, die in 1918 door een geschikt dieet bij honden deze ziekte zag tot stand komen. Hij voedde deze jonge honden met 300 cm^3 magermelk, wit tarwebrood, 10 cm^3 lijnolie, 5 à 10 gr. gist, 3 cm^3 sinaasappel, 1 à 2 gr. keukenzout per dag, en stelde na 6 weken rachitis vast. De ziekte wordt veel aangetroffen, vroeger meer dan nu, bij jonge kinderen beneden de drie jaar; door ontkalking en phosphorverlies hebben de beenderen slechts een gedeeltelijke stevigheid en buigen door in x vorm. Systematische proeven bewezen de genezing, door het gebruik van volle melk, boter en levertraan. Reeds vanaf 1922 kon Mac Collum vit. D onderscheiden van de ook in levertraan aanwezige vit. A. Hij oxydeerde de onverzeepbare fractie, die na twaalf uur niet langer

oogziekten genas, wel de rachitis, weldra werd ook de genezende invloed van de bestraling op rachitis opgemerkt (Huldschinsky). Ratten met vit. D vrije dieet in het donker, werden rachitisch, maar genazen bij belichting. De dieren genazen ook wanneer de ledige kooien bestraald werden en de zieke ratten hierin gebracht (voedselresten, stroo, mest). Hess en Steenboek bewezen dat voedsel antirachitisch kan worden na bestraling met u.v. licht of zonlicht. Dus in de huid der ratten evenals in de activeerbare voedingsstoffen is een provitamine, die na bestraling werkzaam wordt. Onderzoek naar verontreiniging van cholesterol, leidde tot ergosterol uit gist en schimmels (Windaus) die door bestraling over de overgangsstadia lumisterol en tachysterol tot vitamine D wordt omgezet.

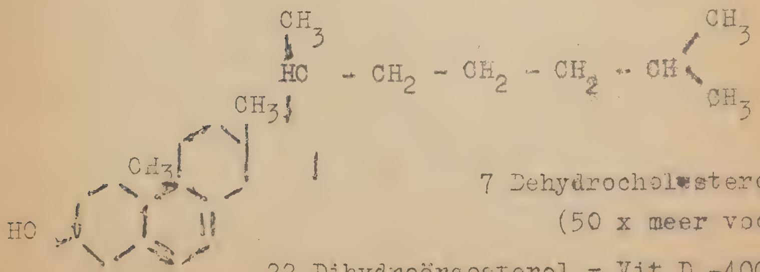
Tabel



Ergosterol



Vitamine D_2 40000 I.E./mg.
1 I.E. = 0,025 mg.



7 Dehydrocholesterol=Vit. D_3-40000 (50 x meer voor kuikens) I.E./mg.

22 Dihydroërgosterol = Vit D_4-4000 I.E./mg.

7 Dehydrositosterol = Vit D_5-1300 I.E./mg.

Bestraalde ergosterol bleek echter niet identisch te zijn met de antirachitische factor van levertraan, die voor kuikens 50 maal meer werkzaam bleek te zijn. Het onderzoek bewees dat de natuurlijke vitamine uit levertraan, bestraalde 7 dehydrocholesterol is (vit. D_3). Het werd in 1936 door Broekman uit tonijnleverolie geïsoleerd en in 1937 als zuiver kristallijn verkregen. Er zijn nog andere verbindingen met vit. D werking na bestraling. Zij behooren tot den groep der steriden. Door de bestraling wordt een koolstofring geopend, er ontstaat een dubbele binding, maar de zijketen blijft onbeïnvloed (vit. D_2, D_3, D_4, D_5).
Vitamine D_3 is echter de meest werkzame en natuurlijke vitamine (zie tabel).

Eigenschappen :

Ergosterol en 7 dehydrocholesterol zijn allebei linksdraaiënd uit alcohol aether mengsels. Ze zijn moeilijk oplosbaar in koude organische oplosmiddelen, onoplosb. in water, oplosbaar in warme alcohol. Ze slaan quantitatief neer met digitonine, en zijn zeer gevoelig aan licht en oxydatiemiddelen. De vitaminen zelf zijn in vetten en vetoplosmiddelen goed oplosbaar en worden door digitonine niet neergeslagen. Wegens de drie geconjegeerde bindingen (dubbele bindingen) hebben ze een sterke absorptieband bij 256 mμ. (provitamine bij 281 mμ.) Ook vitamine D_2 is rechtsdraaiend, oplosbaar in organische oplosmiddelen, onoplosbaar in water, veel meer bestendig tegenover de zuurstof der lucht, H_2O_2 en stabiel tegenover de warmte (smeltpunt 115°-116°). Vit. D_3 is ook rechtsdraaiend en smeltpunt : 82-84°, en analoge eigenschappen.

Voorkomen :

Vitamine D komt in de natuur maar zelden voor, wel de provitaminen, bijv. in de huid in kleine concentratie. De hoofdbron is vischleverolie, andere bronnen zijn boter, melk, eigeel, schimmels. Gehalte aan vit. D in voedingsstoffen (in γ per 100 gr.)

Kalfslever	0.50	koemelk	0,2 - 0,4
Varkenslever	4,50	eigeel	20 - 30
Haring, sardien	1.300	boter	5 - 10
Levertraan	1.200	schimmels	8 - 10
Tonijnlevertraan	400000		
Heilbotlevertraan	20000		

De dagelijksche behoefte is voor gezonde kinderen 2 γ, met een optimum van ongeveer 10 γ. Een volwassene heeft niet meer noodig. Ter genezing van rachitische kinderen zal men liefst een 5 maal zoo groote dosis toedienen. De behoefte is ook afhankelijk van de verhouding Ca : P in het voedsel, en wordt verder verhoogd gedurende de puberteit, zwangerschap, infectieziekten, maag en darmstofingen.

Aangerijkte levertraan, met bijv. 600 I.E./ ccm.
Vit. D wordt met stoel, ook met melk afgescheiden (toediening aan zwangere vrouwen om het gehalte der melk te verhoogen).

Bepalingsmethoden :

a) Biologische :
Groeiende ratten worden met vitaminevrije dieet gevoed in den donker. Bij de prophylactische test wordt hieraan de te onderzoeken stof toegevoegd. Blijven 80% der dieren van rachitis bevrijd dan is het preparaat wel werkzaam. Diagnose met röntgenonderzoek of bepaling van aschgehalte der gedroogde beenderen.
(gezonde ratten 45%, rachitische ratten ± 35 %.).

In de curatieve test wordt de te bepalen stof slechts gebruikt bij de eerste symptomen tot de genezing wordt vastgesteld doorloopende röntgenopnamen of aan het aschgehalte der beenderen, of door de line-test.
Hierbij worden de beenderen in de lengte gespleten, in $AgNO_3$ gedrenkt en belicht (zwartkleuring, waar Caphosphaat $\longrightarrow$ Ag_3PO_4).

b) chemische :
Weinig gevoelig en onspecifiek, slechts toepasselijk op de bepaling van calciferol in geconcentreerde oplossing.

I I.E. : 0,1 γ bestr. ergosterol of 0,025 γ vit. D_2 (calciferol)
I klinische eenheid = 100 I.E.
I biologische of ratten verhoedingsdosis : 0,02 - 0,03 γ / dag.

Toepassingen :

Als voorbehoedmiddel en ter genezing van alle gevallen van rachitis, vooral bij kleine kinderen. Osteomalacie en osteoporosis wordt gewoonlijk door Calciferol toediening zeer gunstig behandeld, evenals alle gevallen waar naar een verhooging van den bloedcalciumspiegel (tuberculose) gestreefd wordt. D hypervitaminosen zijn echter steeds te duchten. Het vitamine wordt toegediend onder vorm van olieachtige oplossing of tabletten met 0,1 à 0,2 mg. Calciferol (4 à 8000 I.E.). Het wordt soms in de olieachtige oplossing gecombineerd aan vitamine A. Gewone dosissen : beneden een jaar, 2 à 4000 I.E.; van 1 tot 10 jaar, 4 à 8000 I.E.; volwassenen, 10 à 12000 I.E. per dag.

Levertraan : oleum jecoris aselli.

De vette olie uit den verschen lever van Gadus Morhea, de kabeljauw, en andere soorten van het geslacht Gadus (Gadus aeglefinus de schelvisch; G.Calliaris, de kabeljauw der oostzee; G.Virens, de koolvisch) groote visschen van 20 à 40 Kgr., die leven in bank in den N.Atlantischen Oceaan en in den Stillen Oceaan.
Ze komen jaarlijks naar de kusten van Noorwegen, New Foundland, IJsland van Januari tot Maart voor het eileggen. De vischvangst geschiedt aan de Lofoden rond Februari. Op de kusten van Finmarken gebeurt de vischvangst tot in de late lente en de kabeljauw is daar steeds vergezeld van kleinere visschen, haringen.
Om deze laatste reden vermindert de olie van kwaliteit met het vorderen van het jaargetijde en is deze tweede soort minder hoog geschat. De lever van volgevreten dieren wordt ook voor de oliegewinning verworpen (meer onderhevig aan oxydatie en verharsing). Het oliegehalte der levers varieert van 30 tot 60%. Na slachting der dieren wordt de lever met zorg weggenomen en versch in de koude weggelegd. Door afkoeling aan 0° scheidt de olie een vast bestanddeel (leverstearine 20%) af, die aan 0° wordt afgefiltreerd.

Meestal echter wordt de olie door de stroommethode geëxtraheerd. De gesorteerde en gezuiverde levers worden met waterdamp behandeld bij 60-70% gedurende 30 min. Bij deze eerste behandeling wordt ongeveer 75% van de totale hoeveelheid olie afgescheiden. Ze wordt afgetapt, warm gecoleerd en met lauw water gewasschen. Dan wordt ze in groote tanks afgekoeld (aan 2-5°) en koud gefiltreerd of afgeschonken. Om de oxydatie te vermijden bij de smelting wordt soms de lucht vervangen door koolzuurgas of stikstof. De raffinatie kan verder worden doorgevoerd door behandeling met adsorbeerende klei, bleekaarde of silica. De leverresten worden aan een tweede extractie aan een hoogere temperatuur onderworpen en leveren dan een donker gekleurde en geurige olie. De derde extractieolie is alleen voor de techniek bestemd.
De officineele olie moet afkomstig zijn van de versche lever, verkregen door koud persen of smelten aan een temperatuur lager dan 85°.

Samenstelling :

Glyceriden van verzadigde en onverzadigde vetzuren, met 0,7 à 1,5 % onverzeepbare bestanddeelen (cholesterol, squaleen, vit.A, en vit. D_3). Het vitamine A gehalte is veranderlijk met den voedingstoestand (best na kuitschieten) en moet minstens 600 I.E./gr. bedragen. Het vitamine D_3 gehalte daarentegen 85 I.E./gr. Slechts 10 à 18% der vetzuren zijn verzadigd (myristine-, palmitine-, stearinezuur), de onverzadigde zijn weinig bekend. Levertraan bevat, zijn ook in kleine hoeveelheden, allerlei minerale bestanddeelen (Fe, I, Br, S, P, Mn, Ca, Mg, Na, Cl). Ze is zeer onderhevig aan autoöxydatie van de onverzadigde vetzuren; er is bovendien ontbinding, polymerisatie, gevolgd van korstvorming en die omzettingen worden gecatalyseerd door het licht, door metalen, door bloedpigmenten. Daar, bij het conserveeren de zuurgraad en het zuurgehalte duidelijk en zeer snel toenemen is de bepaling van het zuurgetal een goed criterium van verscheid. Dit getal moet de 3,0 niet overtreffen (bruine natuurtraan tot 1[illegible], technische tot 30 en meer)
Het Joodgetal bedraagt 155 à 180. De kleur moet bleek geel zijn en de olie moet aan 0° helder blijven. Identificatiereactie van

Tortelli Jaffé = opl. in chloroform + ijsazijn + oploss. van broom in chloroform : roze, dan groene kleur.

Bepaling vitamine A.

Biologische methode (zie supplt. B. PH.IV).
Spectrophotometrische methode.
Men bepaalt de lichtabsorptiecoëfficiënt aan de golflengte van 3280 A° van het onverzeepbare gedeelte van levertraan, opgelost in alcohol. Die absorptiecoëfficiënt E wordt eveneens bepaald door een laag van I cm. van een 1% vit. A standaardpreparaat, dat een gekend aantal "a" internationale eenheden bevat.

E =

$$E = \log. \frac{I^0}{I}$$

I^0= invallende lichtsterkte, I : lichtsterkte na doorloop.
Zij E' de absorptiecoëfficiënt voor de onderzochte levertraan, dan zal het gehalte aan Internationale vit.A eenheden van dit preparaat uitgedrukt worden door de verhouding :

$$X = a \frac{E'}{E}$$

Het vitamine-A-gehalte van de levertraan kan ook bepaald worden met de methode van Carr en Price. Men vergelijkt hiertoe lie... met een standaardolie waarvan het aantal Blauweenheden of Lovibond-eenheden juist gekend is (bijv. 10 standaard blauweenheden per 20 mg.). Een zelfde hoeveelheid (20 mg.) van beide oliën worden in 0,1 cm^3 chloroform opgelost, 1 cm^3 chloroformische antimoontrichloride oplossing toegevoegd, en de gelijkheid van tint aanstonds vergeleken in den Lovibond tintometer.
De nauwkeurigheid bedraagt niet meer dan 10%.
Vitamine D_3 wordt biologisch bepaald op ratten.

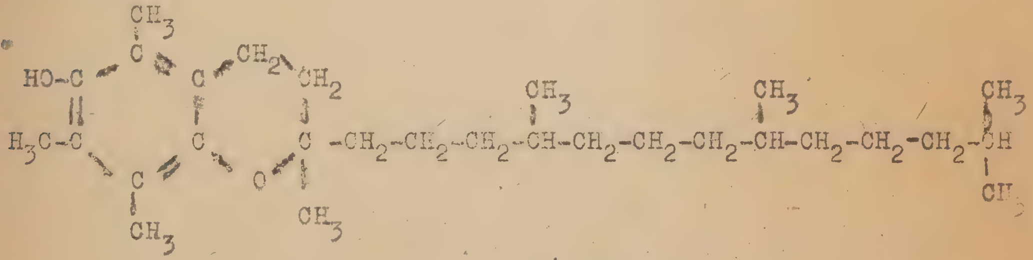
Toepassingen :

Tegen rachitis, tuberculose, Levertraanzalf ter genezing van wonden en etterbuilen. Andere vitaminerijke oliën kunnen gewonnen worden uit de heilbot, de walvisch, de tonijn, de zwaardvisch.

Vitamine E : Tocopherol.

De antisteriliteitsvitamine is een regulator, een dieetfactor die men in plantenzaadolie vindt en voor de normale voortplanting van ratten noodzakelijk (Evans). Later werd het voorkomen van een in vet oplosbaren factor in het voeder bevestigd; ontbrak die factor dan had dit steriliteit voor gevolg. Groen voeder in den zomer kon de steriliteit bij koeien en zeugen insgelijks verhinderen. In 1936 slaagde Evans er in uit de olie van tarwekiemen twee natuurlijke E vitaminen te isoleeren α en β Tocopherol. Later werd nog een γ Tocopherol synthetisch bereid.
Het tocopherolmolecule is samengesteld uit een chromeanring en een aan phytol analoge zijketen. Het belangrijkste tocopherol is een gele olie, stollend aan 0°, rechtsdraaiend, zeer oplosbaar in vetten, oliën, aether, benzine, chloroform, alcohol, aceton, onoplosbaar in water, weinig gevoelig voor luchtzuurstof en verwarming maar gevoelig aan u.v. licht en sterke oxydantia (Ozon, $KMnO_4$). Organische peroxyden bij ranswording der vetten hebben een vernietigende invloed. De extractie met aether die peroxyden bevat, voert tot een groote gehaltevermindering.

De tocopherolen zijn rechtsdraaiend; het synthetisch en optisch onwerkzaam product, heeft echter geen geringe biologische activiteit.



α Tocopherol.

β tocopherol heeft slechts één CH_3 groep minder. γ heeft vermoedelijk een o dimethylhydrochinonkern.

Voorkomen :

Zeer verspreid in dier- en plantenrijk, zij ook in geringe concentratie, vooral in tarwekiemen (30 mg.%). De olie hiervan bevat tot 1300 E eenheden/100 g. (I.E. eenheid is voor α Tocopherol 1-3 mg., voor β Toc. tot 8 mg., voor γ T. tot 8-10 mg.

Gehalte aan Tocopherol in mg./100 gr.

Olie van tarwekiemen	520
Tarwekiemen	30
Maïskiemen	16
Lijnolie	23
Kropsla	50
Rundsvleesch	3 à 4
Grone kool	6
Eierdooier	3
Boter	2,6

Men begint slechts de E vitaminen in de menschengeneeskunde te gebruiken. Maar ze zijn reeds van groote beteekenis in de veeartsenijkunde. Bij symptoomloose steriliteit of de door Bang bacillen veroorzaakte abortus van runderen en varkens (tot 30% van het vee aangetast, het afwerpen van runderen in Frankrijk verminderde van 35% tot 2% op 2500 geïnfecteerde dieren, na systematische behandeling met vit. E preparaten.

Bepalingsmethoden :

a) Biologische :
Vrouwelijke geslachtsrijpe ratten worden met een vit. E vrij dieet en onderzochte stof behandeld. Indien ze werkzaam zijn is er normale dracht.
De prophylactische test duurt verschillende maanden. De curatieve test levert na enkele weken resultaat op.

b) Colorimetrische methode van Emmerie en Engel.
Door oxydatie van Tocopherol met $FeCl_3$ in aanwezigheid van α, α dipyridyl ontstaat een roode complex verbinding waarvan de kleurintensiteit gemeten wordt. Vit.A en carotenen storen en zijn te verwijderen door adsorptie van klei op kaolien.

c) Colorimetrische methode van Furter en Meyer.
Tocopherolen reageeren in alcoholische oplossing met salpeterzuur, onder vorming van een diep-rood gekleurde verbinding.
Zeer specifiek, carotenen enz. zijn niet mede gedoseerd. Wel sommige inactieve tocopherylchinonen, die tot te hooge waarden voeren.
De potentiometrische titratie met goudchloride is weinig nauwkeurig en niet specifiek.

Klinische Toepassingen :

Bij den mensch tegen vaak herhaalde abortus, vanaf het begin der zwangerschap (samen met corpus luteum extract) en ook bij den man met androsterol. Men gebruikt comprimés met 10 mg α dl.tocopherolacetaat of tarwekiemenolie.

Vitamine K of α phyllochinon :

De antihaemorraghische vitamine werd slechts onlangs als een deficiëntiefactor gekenmerkt. Dam bewees dat vogels en vooral jonge kuikens hieraan zeer gevoelig zijn. Na voeding gedurende twee .. met een voedsel, dat geëxtraheerd werd met vetoplosmiddelen, vertoonden de dieren allerlei bloedingen. Die bloedingen werden niet genezen met ascorbinezuur, noch met levertraan, noch met olie van tarwekiemen, caroteen, gist, eiklaar, maar wel door varkenslever, kool, spinazie, tomaten en vooral luzerne. Hij vond ook dat bij die dieren de bloedstolling gestoord was, door gebrek aan prothrombine. Het bloedstollingsmechanisme zou de overgang zijn van de prothrombine bij aanwezigheid van Ca-ionen, en thrombokinase, naar thrombine. Deze zou het coagulatieproces van omzetting van fibrinogeen naar fibrine mogelijk maken. Bij K avitaminose is in het bloed van het kuiken noch de fibrinogeen noch de thrombobinase verminderd en door toevoer naar Ca worddnde coagulatiestoornissen niet opgeheven.

De proeven kwamen tot het besluit dat de avitaminose bestond in een gebrek aan prothrombine in het bloed. Vit.K is echter niet identisch met prothrombine, die tot de eiwitten behoort of hiervan een werkgroep is. De chemische ontledingen van gezuiverde thrombine of prothrombine preparaten laten geen vit.K groep vermoeden, in de

physilogische proeven hadden de prothrombine preparaten slechts een geringe vit.K werking. Bij den volwassen mensch, bij volledig gebrek aan prothrombine, zijn uiterst kleine hoeveelheden vit.K reeds werkzaam. Van daar de conclusie dat vit.K hoogst waarschijnlijk noodzakelijk is voor de vorming van prothrombine in de lever en dat ze deze biosynthese bevordert.

Wanneer de leverparenchym beschadigd is, dan gaat de prothrombinevorming niet meer, trots de voorhanden vit.K. Bij gevallen van icterus is de verlengde bloedsstollingtijd toe te schrijven aan een hypothrombinaemie. De resorptie van de vetoplosbare vit.K is door gebrek aan galzuren in den darm gestoord en waarschijnlijk de oorzaak van de haemorraghische diathesis; deze doet zich ook voor bij gevallen van steatorrhee icterus catarrhalis, levercirrhose. De biologische vit.K test is dus een leverfunctietest.

Biologische ijkingsmethoden:

I. Methode van Almquist is een praeventieve test. Hierbij wordt de maximale coagulatiestoornis na twee weken bij de kuiken bepaald. Na zeven dagen vit.K vrije dieet worden de dieren in groepen van tien verdeeld. Aan ieder dier van een groep wordt een bepaalde hoeveelheid der te onderzoeken stof toegedeeld. De stollingstijd wordt veertien dagen na het inzetten der proef bepaald. Hoe vitaminerijker het praeparaat hoe kleiner de vertraging der bloedscoagulatie; en er is een lineair verband tusschen de log. der vit.K concentratie (n cm^3 standaardoplossing) en de reciproke stollingsduur:

$$\text{log.concentratie vit. K} = \frac{\text{constante}}{\text{stollingsduur}}$$

Het onbekende preparaat wordt op die manier vergeleken aan de standaardoplossing.

2. Methode van Dam :
De kippen worden met een vit.K vrije dieet gevoed, op draadnetten om de koprophagie en de verontreiniging van het voedsel te verhinderen. Aan het bloedplasma der vitaminevrije dieren wordt een thrombokinasepreparaat toegevoegd en van deze thrombokinase (spierextract) wordt de concentratie bepaald die noodig is om de

stolling binnen 3 minuten bij 39° te bereiken. Hetzelfde wordt gedaan met normaal gevoede dieren.
De coagulatiestoornis wordt uitgedrukt als $R = K/K_n$
K = conc. in het avitaminose geval. K_n=conc. voor normaal bloedplasma.
R = I voor normaal kuiken en grooter in het avitaminose geval.
De Dameenheden worden uitgedrukt in de hoeveelheid vit.K, die een gedevitamineerde kip op drie achtereenvolgende dagen moet worden toegediend om een normale stolling te bereiken. (R=I). Het standaardproduct, bijv. 2 methyl, 1,4 diacetylnaphtohydrochinon bevat 14 millioen Dam eenheden per gram (I.I.E. = 0,07).

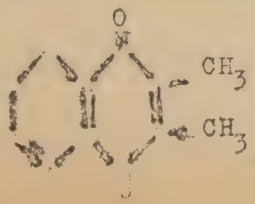
Voorkomen :

Aantal Dameenheden / gram.

Luzerne	200 - 400
Spinazie	400 - 500
Gras	200
Bloemkool	400
Witte Kool	400
Aardappelen	5 - 10
Tomaten	50 - 100
Sojaboonen	25
Varkenslever	50 - 100
Hondlever	70.

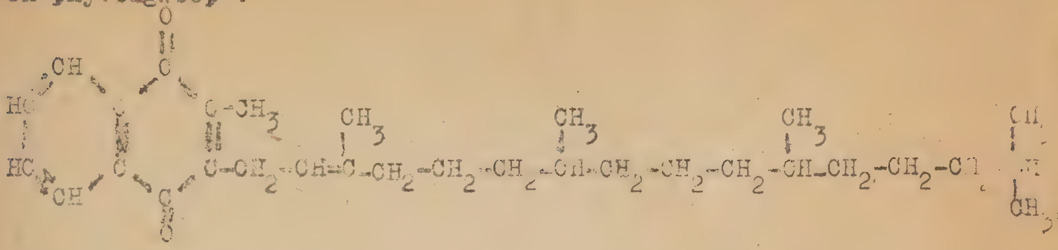
Chemie :

Dank zij de biologische testmethoden werd vit.K zuiver uit luzerne (medicago, sativa) geïsoleerd als een helgele olie, door combinatie van de moleculaire destillatie en de chromatographische adsorptieanalyse. Deze vit.K is niet volkomen identisch met de vit. die uit rotte visch (gevormd door de bacteriën) geïsoleerd werd (vit.K_2). Het absorptiespectrum van vit.K is zeer analoog aan dat van Phtiocol uit tuberkelbacillen verkregen.



Phtiocol.

Vitamine K behoort tot de groep der naphtochinonen, met een methyl en phytolgroep :

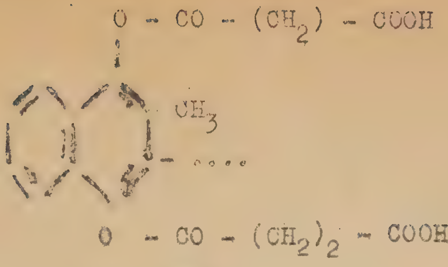


Vit K is : $C_{20}H_{39}$ of 2 methyl - 3 phytyl 1-4 naphtochinon.
Doisy bepaalde de constitutie hiervan, evenals Fieser, en Karrer bereidde vit.K synthetisch.
In Vit.K_2 is de zijketting nog langer, met zes dubbele bindingen.

Deze vit. vormt een redoxsysteem, met waterstoffixatie en overgang naar hydrochinon (aldus voor naphtochinon is de pH : + 0,493 volt), maar heeft een veel zwakker reduceerend vermogen dan vit. C (pH = -0,4v.) en vit. B_2 (pH = - 0,21 v.).

De naphtochinonen zijn ook lichtgevoelig. Deze gevoeligheid vermindert door omzetting in naphtohydrochinon en verestering der hydroxylgroepen. Talrijke naphtochinonderivaten hebben een vit.K werking, b.v. is het 2 methylnaphtochinon meer actief dan de vit.K (25.000.000 in pl.v. 12.000.000 vit. v. K_1 en 8.000.000 v.v. v.K_2). De phytolrest is niet noodig voor een hooge activiteit, wel de aanwezigheid van een methylgroep in positie 2 of 3. De methylgroep wel belangrijk voor de biologische activiteit. Andere voorbeel zijn de vermindering van de biologische activiteit wanneer van lactoflavine de beide CH_3 groepen worden afgesplitst of vervang door aethylgroepen. Vit.E met drie hernaethylgroepen heeft de maximale activiteit en α tocopherol is 2 à 3 maal zoo werkzaam als β tocopherol.

De naphtochinonen kunnen gereduceerd worden en met zuren veresterd (azijnzuur, barnsteenzuur) zonder verlies aan activiteit. Deze esters zijn veel minder lichtgevoelig. Het methyl disuccinylnaphtohydiochinon en vooral het Nazout is oplosbaar in water 15.000.000 D.E./ gram).



Klinische Toepassingen :

Bij alle vormen van resorptie K avitaminosen (spruw, icterus, steatorrhee), bij operatiebloedingen, bloeding van boorlingen,enz. Eerst gebruikte men min of meer zuivere vit. K preparaten met galzuurzouten in capsulen (totale dosis per dag 250.000 D.E. + 2 à 4 g. Na-taurocholaat). Nu verkiest men synthetische preparaten, die in water oplosbaar zijn (Synkavit) aan een dosis van 15 à 30 mgr.

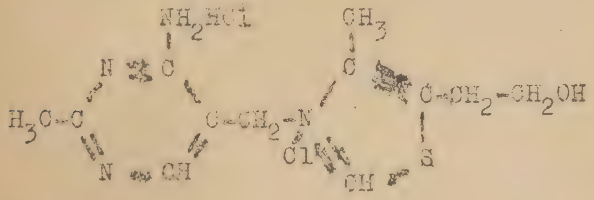
De in water oplosbare vitaminen :

De gist zou tot achttien in water oplosbare factoren bevatten, waarvan een twaalftal duidelijk bekend zijn (zie tabel)
vit. B_1 anourine, antineuritische factor.
vit. B_2 lactoflavine, riboflavine, thermolabiele groeifactor.
vit. B_3 duifgroeifactor, thermolabiel.
vit. B_4 antiparalytische factor
vit. B_5 duifgroeifactor, thermostabiel.
vit. B_6 adermine, antipellagrafactor bij de ratten.
vit. B_7 darmvitamine.
vit. B_w filtraatgroeifactor (groeifactor van ratten).

Nicotinezuuramide. vit. P.P. antipellagrafactor bij den mens.
Pantothenzuur, antipellagra bij de hoederen, tegen dermatitis bij kuikens.
Haemogeen uitwendige anaemiafactor.
Biotine, groeifactor van bacteriën en gist.
Vit. H', aminobenzoëzuur, groeifactor van bacteriën.

Vitamine B_1 ; aneurine :

Het is de thermolabiele factor die door autoclaveering van de gist aan 120° volledig vernietigd wordt. Door Eijckman werd de beri-beri door gebrek aan aneurine voor het eerst als deficiëntieziekte gekenmerkt. Door Jansen en Donath werd uit rijstzemelen wel kristallijne aneurine geïsoleerd. Windaus extraheerde in 1930 uit gist ook kristallijne vit. B_1 en bewees dat ze zwavel bevatte en als samenstelling had $C_{12}H_{18}ON_4SCl_2$. Het chemisch onderzoek bewees, dat ze is samengesteld uit de koppeling van een pyrimidine en een thiazolring.



Aneurine (Vit. B_1)

Als vrije basis is ze weinig bestendig, maar het hydrochloride kristalliseert vrij goed, heeft een scherp smeltpunt aan 220-221°; is oplosbaar in water, alcohol, heeft twee karakteristieke absorptiebanden in het u.v. licht. Als hydrochloride kan het tot bij 100° verwarmd worden zonder activiteitsverlies.
Door voorzichtige oxydatie gaat het over naar thiochroom (het bevat dan drie H minder en er is een brugvalentie tusschen de thiazol en de pyrimidinering), die door bestraling met u.v. licht een intense blauw violette fluorescentie vertoont. In de natuur komt aneurine voor als gedeeltelijk veresterd met twee moleculen phosphorzuur; door oxydatie ontstaat dan thiochroomdiphosphorzuur. Er is dan ook een blauw violette fluorescentie maar die gaat niet over in isobutanol. Aneurine is bovendien zeer adsorbeerbaar, bijv. aan voller's aarde, in zuur en hydroalcoholisch midden (scheiding van de andere B factoren die veel minder adsorbeerb.zijn).

De physiologische beteekenis van vit. B_1 is zeer belangrijk Ze is noodig voor de normale koolhydraatstofwisseling en de decarboxyleering van het pyrodruivenzuur, dat ontstaat als tusschen-

product bij de afbraak van glucose, en dat door een ferment waarvan aneurine (cocarboxylase) het coferment is, tot acetaldehyde en koolzuur omgezet wordt. De cocarboxylase is de diphosphoorzuurester van aneurine. De opstapeling van het pyrodruivenzuur in het bloed, de weefsels of het centraal zenuwstelsel veroorzaakt de karakteristieke krampen en verlammingen. Toevoer van de vit. B_1 doet het pyrodruivenzuurgehalte zeer snel vallen, en ook de kramptoestand (bij duiven), hypothermie en bradycardie. Er is synergismus tusschen vit. B_1 en insuline. B_1 is insulinesparen, maar in g... van hypoglycaemie werkt vit. B_1 antikonvulsief. Bovendien heeft vit. B_1 een belangrijke rol bij het metabolisme der nucleïnen en der purinebasen. Ook bij de vetstofwisseling schijnt vit. B_1 iets te doen te hebben. Wanneer ze in voldoende mate aanwezig is, kan ze, bij vetarmevoeding van het organisme, in staat zijn uit koolhydraten vet op te bouwen.

Vit. B_1 gebrek tot een vergevorderd stadium uit zich in degeneratieve veranderingen, die het zenuwstelsel, de musculatuur en het hart omvatten. Aneurine wordt bij de zenuwprikkeling vrij gemaakt en de pyrimidine van aneurine kan de zwaarste kramptoestanden opheffen. Door ophoopingvan pyrodruivenzuur wordt de hartfunctie zwaar gestoord (sinusbradycardie), en ook door de vertraagde omzetting tot melkzuur is er vermeerdering van adenylzuur in de spieren. De aneurinevrije spier van de duif kan ook de cystine niet meer tot cysteïne hydreeren. De werking van acethylcholine en de overdracht de parasympathische zenuwprikkels wordt door aneurine versterkt (de cholinesterase zou geremd zijn). De darmmotiliteit evenals de eetlust worden vermeerderd. Het gebruik en de behoefte is niet constant en afhankelijk van den aard der voeding. Ze is des te hooger, dat meer koolhydraten verbruikt worden en ook meer eiwitten waaruit via aminozuren koolhydraten gevormd worden. De quotient dagelijksche aneurineopname in γ / dagelijksch verbruik aan calorieën (niet uit vetten) is ± 0,3. De behoefte is ook afhankelijk van ras, ouderdom, klimaat. Als minimum wordt aangenomen 0,6 mg. de optimale hoeveelheid is 1 à 2 mg. per dag. Ze blijkt ook onontbeerlijk voor den groei en de ontwikkeling van lagere organismen (schimmels, bacteriën, protozoën).

Microben kunnen de thiazol en de pyrimidinecomponenten tot een volledig aneurine molecule samen koppelen (Phycomices soorten en Staph. Aureus). Anderen hebben behoefte aan thiazol of pyrimidine, daar ze het twcede gedeelte kunnen synthetiseeren (bewezen d.m. kunstvoedingsbodem waar slechts één der twee componenten in voorkomt). Verder zullen bepaalde schimmels een absolute symbiose vertoonen, wanneer ze samen gebracht worden : de eene levert pyrimidine, de andere thiazol. Niet alleen planten, maar ook talrijke microörganismen kunnen vit. B_1 synthetiseeren.
In vrouwenmelk is het gehalte afhankelijk van het opgenomen voedsel, maar koemelk bevat er steeds, zelfs wanneer de toevoer gering is, want in de spijsverteringbuis (pens) leven microben die de synthese kunnen bewerken. De vit. wordt dan in het darmkanaal geresorbeerd en geraakt van daar in de melkklieren.
Ook ratten hebben in de coecumen de cholon bacteriën met synthetiseerend vermogen. De vit. B_1 wordt echter slechts geresorbeerd wanneer de drekstoffen weer opgegeten worden (na vertering van de bacteriën zelf is de resorptie wel weer mogelijk). Deze vitaminerefectie kan aanleiding geven tot misrekening bij de dieetproeven.

Bepalingsmethoden:

a) Biologische (op duiven en ratten).
Duiven worden gedurende 3 à 4 weken met een aneurine vrije dieet (gepolijste rijst) gevoed. Dan is er een temperatuurverlaging van 4 à 5°, bradychardie, verlamming en kramp (halsspier, kop overgeslagen). Toevoer van het vitaminepreparaat geneest de krampen binnen enkele uren; 2 γ zuivere aneurine, of 10 mg. adsorbaat van Voller's aarde, geeft volledige genezing. Bij gebruik van ratten, worden deze dieren gevoed met 68% zetmeel, 18% caseïne, 8% botervet, 4% zoutmengsel, 2% levertraan.

De caseïne en de zetmeel moeten met alcohol geëxtraheerd worden en daarna enkele uren aan 100° verwarmd. Hierbij voegt men nog geautoclaveerde gist (zonder vit. B_1). Men kiest dieren van 40 à 60 g.. Na 3 à 4 weken aneurinevrije voeding is er groeistilstand. Men bepaalt dan de gewichtstoename zoowel voor het ongekende preparaat als voor het standaardpreparaat. De polstest geschiedt met

behulp van een electrocardiogram. Bij volledige deficiëntie zinkt de polsslag van 500 tot op de helft.

De Phycomycestest steunt hierop dat voor bepaalde phycomycessoorten de ontwikkeling van het mycelium van het vit. B_1 gehalte van den voedingsbodem afhangt. Voor 1 mgr. schimmelmycelium zijn bijv. 10^{-9} gr. vit. B_1 noodig.

b) Chemische methoden :

De thiochroommethode. Door voorzichtige oxydatie met kaliumferricyanide in alkalisch midden wordt de aneurine omgezet tot thiochroom, die met isobutanol wordt uitgeschud. De fluorescentieintensiteit wordt vergeleken met een reeks standaardoplossingen, bijv. aan kinine in zwavelzuur N/10. De oplossing wordt slechts alcalisch gemaakt (pH : 10) nadat de ferricyanide ingewerkt heeft, omdat het alcali vit. B_1, maar niet de thiochroom ontleedt.

Andere colorimetrische reacties worden ook gebezigd, nm. het diazobenzolsulfonzuur, dat zich condenseert met aneurine tot een roode karakteristieke verbinding (Kinnersley en Peters).

Eenheden :

I Int. E. = 3 γ aneurinehydrochloride. De Shermaneenheid is de hoeveelheid, die dagelijks aan ratten moet worden toegediend om gedurende 8 weken, een wekelijksche gewichtstoename van 3 g. te bekomen (ongeveer 0,5 I.E.).
De duifdagdosis : 2 γ op 10 mg. adsorbaat.

Voorkomen :

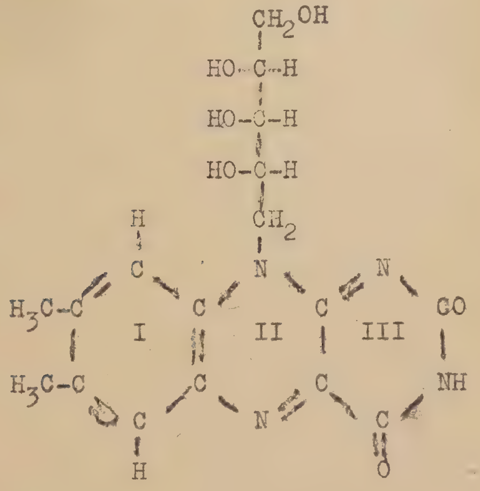
Vit. B_1 komt veel in het plantenrijk voor en wordt in het dierlijk organisme uit het voedsel opgenomen. Rijkste bronnen zijn gist (vooral biergist : 7000 γ /100 gr., vol tarwe- en roggebrood, lever, vleesch, groenten, zooals tomaten, aardappelen, groene erwten, sla, spinazie, enz...) Bij het koken der groenten gaat een groot gedeelte der vitaminen verloren of in het water over, dat best samen zou moeten worden gebruikt.
Hyperavitaminosegevallen zijn niet bekend.

Zeer talrijk zijn de klinische toepassingen; gezien de veelzijdige catalyseerende invloed van vit. B_1 op talrijke physiologische processen zijn die niet steeds specifiek.
De belangrijkste aanwijzingen zijn de avitaminosegevallen, neuritis onder zijn verschillende vormen, neuralgia, eetlustgebrek, enz. De gewone dosis bedraagt 2 à 20 mg. per dag en kan zonder bezwaar verhoogd worden.

Vitamine B_2 of lactoflavine, riboflavine :

Nevens de aneuritische factor komen in de gist verschillende voedingsfactoren voor die temperatuurbestendig zijn. Men scheidt ze bijv. van de B_1 factor door de gist in het autoclaaf gedurende 2 uur aan 120° te verwarmen, waarbij de aneurine volledig vernietigd wordt. Het onderscheid tusschen de verschillende B_2 factoren is des te moeilijker dat ze gewoonlijk slechts in combinatie werken, bijzonderlijk bij den mensch.

Het onderscheid van vit. B_2 van de andere factoren en het isoleeren als zuivere stof werd mogelijk op grond van hun physiologische werking.



Vitamine B_2 Lactoflavine.

Vit. B_2 behoort tot de groep der flavinen of lyochromen. Ze is samengesteld uit een gemethylleerde isoalloxazinring, gekoppeld aan ribose. De twee CH_3 groepen in kern I zijn noodzakelijk voor de physiologische werking.

De zuivere stof is oplosbaar in water, geel gekleurd, weinig gevoelig aan verwarming, minerale zure, oxydantia. Ze kristalliseert als fijne, gele naaldjes die bij 239° smelten. Ze fluoresceert vooral in alcalische oplossing en wordt aan het licht omgezet in lumiflavine (ribose vervangen door CH_3 groep) die oplosbaar is in chloroform met een intense groene fluorescentie. Bij belichting in neutraal of zuur milieu ontstaat lumichroom. Lactoflavine kan ook gereduceerd worden in een kleurlooze verbinding met 2H meer (leucolactoflavine), door schudden aan de lucht wordt de oplossing weer geel gekleurd (terugkeer naar flavine).

Physiologische Eigenschappen :

De phosphorzuurester van lactoflavine is het coferment van het zoogenaamd geel ademhalingsferment, dat in iedere cel voorhanden is, vooral in de lever en de nieren. Dit ferment werkt als een oxydo-reductiesysteem, gecombineerd aan een niet dialyseerbaar proteïne. Buiten haar rol als bestanddeel van het geel ferment, vormt het een belangrijke fractie van een ander diastase, nl. de aminoacidodesaminare. Dit ferment verwerkt de desaminatie der d. aminozuren in de nieren.

De gele ademhalingsfermenten zijn samengesteld uit een verdunde lactoflavinephosphorzuur en een molecule adenylzuur. Beide verbindingen zijn met hun phosphorzuurgroepen aan elkaar gekoppeld (Flavine Diminedinucleotide). De substraatspecificiteit wordt dan door de hieraan gebonden proteïne bepaald. Bekende gele fermenten zijn de aminosacidodesaminase der nieren, de xanthindehydase (het Schardingerferment der melk) de diaphorasen I en 2. Lactoflavine is bij uitstek de groeifactor en de hoofdvertegenwoordiger van de groeibevorderende vitaminen. Lactoflavine kan in verband met haar grooten invloed op de koolhydraatstofwisseling de vitamine-B-behoefte aanzienlijk verminderen. Bij diabetes doet

zij het verhoogd suikergehalte van het bloed dalen, houdt het glycogeengehalte van de lever in stand, en beïnvloedt in gunstigen zin de gevallen van catarrhale icterussen en levercirrhose.

Bepalingsmethoden :

a) Biologische :

De ratten worden gevoed met een Shermandieet (zie vit. B_1) met er nog bij een alcoholisch tarwezemelenextract met vit. E en B_1 (n overmaat). De ratteneenheid is de kleinste dagelijksche hoeveelheid die na 4 weken behandeling een gewichtstoename van 40 gr. verwekt. Ze stemt overeen met 8 à 10 γ lactoflavine. Naar Bouquin en Sherman is de rattenenheid die hoeveelheid, die gedurende 4 tot 8 weken bij jonge ratten een wekelijksche gewichtstoename van 3 gr. verwekt.

b) Chemische :

I. Methode van Kuhn, : Lactoflavine wordt door belichting in alcalisch midden tot lumiflavine omgezet, die met chloroform wordt uitgeschud. De kleurintensiteit wordt in den stufenphotometer gemeten en het gehalte wordt op een ijkkromme afgelezen. Een gedeelte der vit. B_2 wordt hierbij echter vernietigd.

II. Methode van Emmerie : Lactoflavine wordt met methanol geëxtraheerd en aan loodsulfide geadsorbeerd en daarna met een mengsel van water, pyridine en ijsazijn geëlueerd. Na oxydatie der vreemde kleurstoffen met kaliumpermanganaat wordt in het eluaat de intensiteit der gele kleur van het lactoflavine in den stufenphotometer waargenomen (filter S 47).

Bij de bepaling in lever en kaas is de adsorptie overbodig. Men extraheert met methanol onder matige verwarming. Na afkoeling wordt azijnzuur toegevoegd. Na schudden wordt gefiltreerd, en 1 à 2 cmc $KMnO_4$ opl. 4 % worden toegevoegd, waarvan na een minuut de overmaat ontleed wordt met waterstofperoxyde (3%). Van het helder filtraat wordt de kleurintensiteit gemeten.

Voorkomen :

mg. lactoflavine in I kg. versche stof.

Lever	10 - 20	koemelk	1 - 2
Eigeel	10 - 15	vrouwenmelk	0,15 - 0,5

bijnier	5 - 10	tarwebrood	0,5
maltextract	1 - 5	aardappelen	0,5
volle gerst	0,5 - 1	spinazie	2
gist	10 - 30	groene kool	1,5
vitox (gistextr.)	25	magere kaas	2 - 4

Gezien de algemeene verspreiding der lactoflavine schijnt een gebrek aan deze vitamine niet te bestaan. Bij proefdieren kan men nochtans de symptomen van een avitaminose te voorschijn roepen en vooral groeistilstand (gezien); daarom worden lactoflavinenpreparaten klinisch toegepast bij verachterde groei der zuigelingen.

Nicotinezuuramide Vitamine PP (preventing pellagra).

De veelvuldigheid der stoornissen bij gebrek aan nicotinezuuramide maken het waarschijnlijk dat die stof in het organisme op verscheidene wijze en verscheidene plaatsen in de stofwisseling ingrijpt. Nicotinezuur is sinds lang bekend, maar slechts veel later bleek het belang van zijn physiologische werking. Er zijn twee stoffen bekend die van pellagra vrijwaren, nl. nicotinezuur en nicotinezuuramide; beide zijn pyridinederivaten met een betrekkelijke groote constitutiespecifiteit.

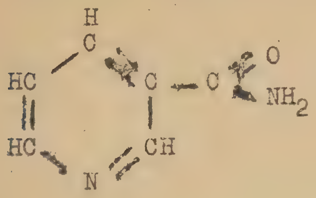
Voorkomen :

Het amide is zeer verspreid in plant en dier maar in veranderlijke verhouding. Gist is de voornaamste bron (vooral biergist 100 mg.%); ook lever van os en varken (25 mg.%), tarwevolkoorn, maïs, rogge, spek, oliën, ui, appelen, havervlokken.

Bereiding :

Gist of rundslever wordt met een dubbele hoeveelheid water 3 maal I uur gekookt. Het extract wordt met amylalcohol uitgeschud; de alcoholische oplossing wordt door fractionneerend neerslaan met alcohol en aceton gezuiverd en aan norietkool geadsorbeerd. Het eluaat wordt in hoog vacuum gedestilleerd, de vitamine wordt met het sublimaat neergeslagen en na verwijdering van het kwikzout als hydrochloride verkregen. Sm. als base 122°.

Komt in plant, dier of mensch voor als zuur en als amide. De stof kan ook verkregen worden door oxydatie van nicotine. Ze is kleurloos, oplosbaar in water, alcohol, aceton, benzol, wordt neergeslagen door Phosphowolfzuur en Kalium Bismut iodide. Reeds door opvatting als vitamine gekend als werkgroep der codehydrasen, algemeene bestanddeelen van de weefsels. Zooals aneurine en lactoflavine is het een hoofdbestanddeel van een fermentsysteem, gebonden aan een specifiek proteïne, en dat als waterstofoverdrager werkt.



Nicotinezuuramide

De codehydrase I (syn. = cozymase) is samengesteld uit I mol. nicotinezuuramide, molecule Adenine, 2 moleculen d ribose en 2 mol. phosphorzuur. De codehydrase 2 bevat een molecule phosphorzuur meer buiten dezelfde bestanddeelen. - Diphospho nicotinezuuramide nucleotide of D.P.N.; en Tri Ph of T.P.N.). De fermenten dezer codehydrasen vormen een belangrijk hydrogenatie- en dehydrogenatiesysteem. Bij de koolhydraatstofwisseling spelen deze een belangrijke rol, samen met het geel ademhalingsferment. Het geel ferment bijv. kan de gehydreerde cozymase weer zelf dehydreeren en zet zich dan om in leucoflavinenzyme, die anderzijds door zuurstof of cytochroom weer geoxydeerd wordt :

Substraat H_2 + Prot" Codehydrase : Prot "' codehydrase H_2

Prot "' Codehydrase H_2 (Prot "" codehydrase
\+)
Flavimenzyme (Flavinenzyme + H_2
)

Flavinenzyme H_2 + O_2 (of andere acceptor) = Flavinenzyne + H_2O_2

Gekoppeld aan een andere eiwitdrager kan de Codehydrase pyrodruivenzuur tot melkzuur reduceeren of ook aethylalcohol tot acetaldehyde oxydeeren. Een molecule D.P.N. proteïne kan per minuut 7000 alcohol moleculen omzetten.

Glucose 6 phosphorzuur wordt ook door T.P.N. phosphohenonzuur gedehydreerd. Gekoppeld echter aan een ander eiwit wordt die laatste verbinding verder geoxydeerd (trapsgewijze omzetting van het substratum door verwisseling van den eiwitdrager). Nicotinezuuramide beïnvloedt met zekerheid de verandering der kleurstof van de roode bloedcellen. Bij gebrek is er immers pophyrinurie en ijzerverlies, en de graad der porphyrinurie gaat parallel met de pellagraäfwijking. De pellagravitamine is het amide en wordt aan de nieren afgescheiden na methyleering der stikstof als betaïne (trigonelline). Trigonelline werd eerst in de boksdoornzaden (Trigonella foenum graecum) aangetroffen, ze komt ook voor in erwten, koffie, thee, cacao.

De behoefte van den mensch aan nicotinezuuramide is vrij gr... en bedraagt 50 à 100 mg. per dag, wat in een gewone verscheiden kost wel voorkomt.

Ratten en muizen hebben geen behoefte aan deze vitamine, daar zij ze zelf synthetiseeren. Daarentegen is ze een onontbeerlijke groeifactor voor menige microorganismen, bijv. staphylococcus aureus, diphteritis bacillen, melkzuurbacteriën, Proteus.

Bepalingsmethoden :

a) Biologische, op honden. Na ongeveer twee maanden nicotinezuurvrije voeding komen typische afwijkingen voor (gewichtsverlies, tong gezwollen en zwart gekleurd, ontstekingen in de mond en den darm). Het is maar een ruwe qualitatieve schatting van de werkzaamheid van een preparaat. Nauwkeuriger is de groeitest op staphylokokken. Bij de bepaling der hoeveelheden aan codehydrase bedient men zich van de haemophilus papaïnfluenzae, waarvan de groeitoename als een functie van de hoeveelheid toegevoegde codehydrase beschouwd wordt.

b) Chemische methoden :
Het extract wordt gezuiverd door neerslaan met loodacetaat of adsorptie aan dierkool. Het helder filtraat wordt met broomcyaan en een primaire of secundaire amine (aniline, p methylaminophenolsulfaat, naphtylamine) behandeld.

Er ontstaan hierbij gele, geel-groene of roode verbindingen. Een andere colorimetrische reactie kan gebruikt worden, nl. door samensmelting van de pyridineverbindingen met 2.4 dinitrochloor benzol ontstaan pyridiumzouten die door alcali tot geel roode derivaten van glutakonaldehyde omgezet worden.

Voorkomen :

Gezien zijn algemeene beteekenis als werkstof, zoowel voor mensch, planten en microörganismen komt de PP vitamine veel in allerlei voedingsstoffen voor. Zie tabel.

mgr. nicotineuuur + nic. z. amide per 100 g. stof.

Rundsvleesch	3,8	aardappelen	1
varkensvleesch	4	tarwemeel	5,3
ossenlever	16	biergist	40 - 65
konijnvleesch	9	bakkergist	12
droge magere melk	10,5	rijst	2,4

Toepassingen :

Vitamine PP geneest zeer specifiek de huiduitslag en de maag- en darmstoornissen van de pellagra bij den mensch. Hetgebruikt dieet moet daarbij nog genoeg vleesch en groene groenten bevatten.

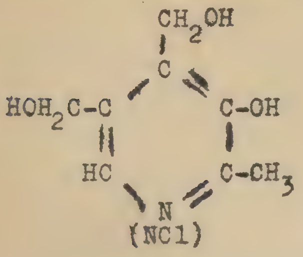
Alle gevallen van porphyrinurie en andere toxische verschijnselen (radiodermitis, lood-, barbituurzuur, sulfanilamide vergiftigingen) worden gunstig beïnvloed. De therapeutische dosen bedragen 50 à 500 mg. nicotinezuuramide per dag.

Hooge dosen van nicotinezuur kunnen onaangename nevenwerkingen uitoefenen en kunnen toxisch zijn, wat niet het geval is voor het amide.

Coramine, het bekend cardiotenicum is diethylnicotinezuuramide.

Vitamine B_6 = Pyridoxyne of adermine :

Gyorgy bewees dat de antipellagrafactor voor ratten niet identisch is met de factor voor menschen. Ze komt voor bij plant en dier en is van een algemeene biologische beteekenis. De rijkste bron is gist (3 - 7500 γ /100 gr.), ook lever, visch,tarwezemelen. Het komt soms voor als adermineproteïnecomplex, dat gevoelig is tegenover alcohol en warmte en een fermentkarakter heeft. Het werd als kristallijne zuivere stof verkregen uit rijstzemelen, gist of rundslever. Het is 3 oxy. 4.5 dioxymethyl 2 methylpyridine. De stof is zeer bestendig tegen verwarming zuren en basen, oplosbaar in water en alcohol, smeltend bij 159° - 160°.



Pyridoxyne

De vitamine wordt slechts biologisch bepaald, daar de chemische reacties niet specifiek zijn. Het proefdier is de rat die na zes weken kunstvoeding geen gewichtstoename meer vertoont, maar wel dermatitis aan de pooten, snuit en ooren, symmetrische haaruitval, vooral rond de oogen. De ratdagdosis is de hoeveelheid B_6 noodig ter genezing per dag toe te dienen (7,5 γ zuivere kristallijne adermine). Bij den mensch zijn de avitaminosesymptomen nogal uiteenloopend : nervositeit, slaaploosheid, maagpijn, zwakte, hypochrome anaemie. De werkstof is van algemeene physiologische beteekenis, noodig voor de ontwikkeling van gist en talrijke bacteriën (melkzuurbacteriën). Bij de normale mensch zou de functie van het centraal zenuwstelsel van een voldoende toevoer van vit. B_6 afhangen, ook zou die stof in betrekking staan met de koolhydraatstofwisseling. De klinische toepassingen zijn beperkt tot de toediening van medicinale gist.

Vitamine B_4 (antiparalytische factor)

Het bestaan van vitamine B_4 wordt betwist; ze zou identisch zijn met de filtraatgroeifactor of adermine hydrochloride, die nochtans geen vitaminewerking had. Deze factor is voor den groei

en de normale ontwikkeling van het kuiken noodig (coordinatie stoornissen, onrustige gang met gestrekte pooten). Gist en aardnoten zijn er zeer rijk aan, ook droog gras, tarwekiemen, varkensnier en hersenen.

Vitamine B_3 en B_5 (groeifactor voor de duif).

De duiven gevoed met een B vitaminevrij dieet, waaraan aneurine en lactoflavine waren toegevoegd groeiden zeer slecht.
De groei werd normaal door bijvoeging van gist bevrijd van B_1 en B_2. De vit. B_3 factor komt voor in het voller's aarde adsorbaat en wordt reeds door verwarming aan 60° vernietigd. In de gist is deze factor van een tweede : vit. B_5 vergezeld. Deze kan gescheiden worden door verwarmen tot 115° in het autoclaaf, van de gist waardoor B_1 en B_3 vernietigd worden. Vit. B_5 is tevens tegen alcali bestand, B_5 niet. Waarschijnlijk vullen vit. B_3 en B_5 hun groeiwerking aan bij de duif.

Pantothenzuur (antikuikendermatitis).

Deze werkstof werd aangetroffen in het filtraat na adsorptie van een ruw lactoflavineëxtract aan voller's aarde. Wanneer die ontbreekt in de voedingsstoffen, ontstaat dermatitis bij hoenders, die te genezen is door toediening van geautoclaveerde gist.
Na een lang chemisch onderzoek werd de stof zuiver bereid uit een leverextract (gezuiverd als brucine of kininezout).

$$HO{-}CH_2{-}\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}{-}CHOH{-}CO{-}NH{-}CH_2{-}CH_2{-}COOH$$ Pantothenzuur

De verbinding is te beschouwen als een condensatie van β alanine en een molecule α, γ dioxy β, β dimethylboterzuur. Het natriumzout kristalliseert als kleurlooze naalden, smeltend bij 121°. Dit natuurlijk pantothenzuur is rechtsdraaiend.
De linksdraaiende component heeft slechts een zeer geringe biologische werkzaamheid (30 maal minder).

Over de physiologische rol van pantothenzuur in het organisme is zoo goed als niets bekend. Het is echter van groote beteekenis voor den groei der gistcellen, bacteriën en ratten. 0,0001 per cm^3 zijn voldoende om den groei van gistcellen te bevorderen. Bij de ratten komt het niet alleen tot groeistoornissen, maar bij zwartharige dieren tot grijsworden der pels. Deze grijshaarfactor is gebleken identisch te zijn met de filtraatfactor, het pantothenzuur. Bij de kip treedt buiten den groeistilstand ook dermatitis op, die eveneens door pantothenzuur kan genezen worden.

De preparaten worden steeds biologisch bepaald. Men legt een kunstdieet aan voor hoenderen die vit. B vrij is; men voegt vit. B_1, B_2, B_6 er aan toe evenals een mengsel van nicotinezuuramide en het zinkzout van pantothenzuur. Bij de dagelijksche dosis van 75 γ zinkzout, werd na 3 à 4 weken een volledige genezing en groeiwerking vastgesteld.

In de streptobacteriën test wordt de groeiwerking o.a. van de melkzuurbacteriën onderzocht(streptobacterium plantarum). Als SbmE wordt de hoeveelheid pantothenzuur aangenomen, die per cm^3 aanwezig moet zijn om een maximale celdeeling binnen de 4 dagen te bewerken. Het aantal cellen wordt gemeten door de troebeling der synthetische voedingsbodem. 1 gr. d pantothenzuur bevat 45-50. 10^6 Sbm (Streptobacterium) eenheden.
In de gistgroeitest bepaalt men met den photometer de groeisnelheid van gistcellen onder invloed der onderzochte preparaten.

Vitamine H' (P.Aminobenzoëzuur).

Het is eveneens een groeifactor voor bacteriën en monocellulaire wezens, waarvan de melkzuurbacteriën de gevoeligste zijn. Aan synthetische voedingsbodem kon worden vastgesteld welke stoffen onontbeerlijk zijn voor de ontwikkeling van deze bacteriën. Buiten talrijke minerale stoffen, aminozuren, glucose, adenine, biotine, aneurine, adermine, nicotinezuur, pantothenzuur werd een factor geïsoleerd en geïdentifieerd als p aminobenzoëzuur. Deze stof bleek hier als de meest werkzame vitamine, die reeds in een

concentratie van 10^{-11} de optimale bacteriëngroei kan bewerken.

Deze werkstof heeft een groote klinische beteekenis gekregen. De werking kan nl. in de hoogste mate geremd worden, wanneer de carboxylgroep door een sulfonzuurgroep vervangen wordt (Sulfonamiden). In tegenstelling met de p aminobenzoëzuur wordt den groei van de melkzuur- en andere bacteriën (B. coli, streptokokken, staphylokokken, pneumokokken, gonokokken) door de sulfanilzuren, in een concentratie van 0,033 % volledig tegengehouden. De groeiremming kan zelf door p aminobenzoëzuur worden opgeheven, in de verhouding 1 : 10000 en op zuiver specifieke wijze. Hetzelfde antagonisme werd waargenomen voor pantothenzuur en het overeenstemmend sulfonzuur; sulfopantothenzuur.

De chemotherapeutische werking der sulfonamiden berust op een verdringing van een werkzaam coferment door een analoog geconstitueerde stof. Hierdoor wordt de stofwisselingketen verbroken, wat leidt tot een zware beschadiging of dood der cel (antiseptische werking).

Vitamine H (huidfactor).

Van deze vitamine is de chemische constitutie nog niet bekend. Ze blijkt steeds aan een eiwitsubstratum gebonden in de natuur voor te komen en als "onoplosbare" factor. Ze zou slechts vrij zijn in magermelk en rijstzemelen. Ze is noodzakelijk voor de normale functie van de huid; bij gebrek hieraan ontstaan bij de rat na 4 à 6 weken huidontstekingen, vooral rondom mond en gewrichten. Bij den mensch zou het de oorzaak zijn van status seborrhoicus; ze zou de giftige factor in het eiklaar onschadelijk maken die eveneens seborrhee kan verwekken. De factor wordt slechts biologisch bepaald met ratten.

Hij komt vooral voor in lever, nier, aardappelen, onzuivere caseïne en vooral gist. Hieraan zou de gunstige behandeling van acne en furunculosis met gist moeten worden toegeschreven.

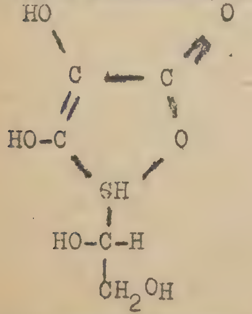
Haemogeen en de antianaemiafactoren :

De haemogeen komt voor in de gist, lever, eiklaar, spiervleesch. Volledig versche lever zou geen haemogeen bevatten en onwerkzaam zijn, wel na een zekeren tijd geconserveerd te zijn (autolyse). Deze factor werd ook aangetoond in plantaardige producten zooals gerst (maltextract), tarwezemelen (volkorenbrood), rijstzemelen, nier en hersenen van zoogdieren. Ze is oplosbaar in water en enkele verdunde organische oplosmiddelen (aceton, alcohol). (zie verder : leverpreparaten).

Vitamine C - L ascorbinezuur :

Ascorbinezuur is de eerste vitamine waarvan de chemische constitutie nauwkeurig bekend was en waarvan het isoleeren en de synthetische bereiding op industrieele schaal mogelijk werd. Vitamine C gebrek (scheurbuik) is bij caviae nogal gemakkelijk te verkrijgen, zoo ook bij den mensch, den aap en het kind boven het jaar. De ziekte trad op bij de kruistochten, lange zeevaarten, ook gedurende de wereldoorlog van 1914.
Scheurbuik in 1913 werd door Hölst en Frölich als avitaminose gekenmerkt (symptomen zijn : huid-, tand-, spierbloedingen, broosheid van de beenderen, gezwollen gewrichten).

De chemie van vit. c begon met het isoleeren van het sterk reduceerend hexyronzuur uit de bijnier en ook uit kool, sinaasappelen, paprika, door Zsent Györgyi. Tillmans isoleerde ook uit citroensap en rosenbottels een zeer reduceerende kristallijne stof, die hij in 1931 - identificeerde met de tegen scheurbuik werkzame stof. Zsent Gyorgyi helderde de structuur op van het l ascorbinezuur; het is op te vatten als het lacton der enolvorm eener 3 ketonhexonzuur. Het werd door totaalsynthese door Reichstein (1933) en Haworth en Hirst, eerst uit l xylose en daarna nog meer gemakkelijk uit d glucose bereid.



L. ascorbinezuur

De stof is gekenmerkt door een sterk reduceerend vermogen (ammoniakaal zilvernitraat, Fehling, ninhydrine, alloxaan).
Ze staat twee atomen waterstof af en gaat in

het dehydro l ascorbinezuur over. Deze kan op haar beurt door een reductiemiddel (bijv. zwavelwaterstof) tot ascorbinezuur weer gereduceerd worden. Bij verder gaande oxydatie ontstaat 2.3 diketo l glulonzuur, die niet weer reduceerbaar is. De zuurstofoxydatie is zeer verhoogd door sporen zware metalen (bijv. koper in konserven, die na het lange koken gewoonlijk weinig vit. C bezitten). De gevoeligheid is tegenover de zuurstof zeer verminderd in zuur milieu. Om voedsel vit. C vrij te maken (in proefdieet), zooals hooi, haver enz. verwarmt men het 4 uur aan 100°. In melk leidt men een snelle luchtstroom na met natronloog zwak alcalisch te hebben gemaakt $(\alpha)^{20}$ = + 24° in water.

De constitutiespecificiteit is zeer groot. Van de 4 isomeren : l,d en l en d isoascorbinezuur is slechts de eerste werkzaam. Ook de andere ascorbinezuren, uit andere zuren zijn veel minder werkzaam.

Het ascorbinezuur kan bereid worden door extractie of door synthesis :

1. Door extractie :

De uitgangsbronnen zijn het perssap van versche kool, het sap van capsicumvruchten (paprika), de rozebottels, iris- of gladiolenbladeren.

De methode gevolgd door Szent-Gyorggi en Svirbely was de volgende : aan het versche sap van paprika wordt een warme en verzadigde oplossing van barium acetaat toegevoegd. Na filtratie wordt weer behandeld met een oplossing van neutraal loodacetaat, lichtjes alcalisch gemaakt met ammoniak (pH : 7,6).

Het ascorbinezuur gaat over in het loodneerslag. Men behandelt dit met de noodige hoeveelheid zwavelzuur (25%) en het ascorbinezuur gaat hierdoor in oplossing. De oplossing wordt in het vacuum drooggedampt, de rest wordt opgenomen met methylacohol en filtraat wordt nog geëxtraheerd met aceton en petroleum aether. Er wordt weer in het vacuum ingedampt tot kristallisatie.

2. In de pharmaceutische nijverheid wordt ascorbinezuur vooral langs synthetischen weg bereid. Men gaat nu bijna uitsluitend uit van d glucose. Deze stof wordt gereduceerd met waterstof onder druk

tot l.sorbitol. De sorbosebacterie (bacetium xylinum) bewerkt de biologische oxydatie tot l.sorbose. De oxydatie wordt nu verder doorgevoerd door kaliumpermanganaat in aanwezigheid van aceton en zwavelzuur. Men bereikt aldus het kaliumzout van het diketogulonzuur, dat met een berekende hoeveelheid zoutzuur tot het vrij zuur wordt omgezet. Dit wordt opgelost in met CO_2 verzadigd water en gedurende 2 uur bij 100° in een stikstofatmosfeer verwarmd, en ontstaat hierbij het zuivere adcorbinezuur.

Ascorbinezuur is een witte kristallijne stof, smeltend met ontleding van af 188°, zeer oplosbaar in water (1 op 4) met zure reactie, De stof is ook oplosbaar in aethanol, methanol, aceton onoplosbaar in aether, benzeen, chloroform, petroleumaether (on-vetting van biologisch materiaal).

Physiologische Werking :

Over de eigenlijke physiologische werking is weinig bekend. Alle werkzame cellen zijn rijk aan vit. C, maar zo komt vooral voor in de endocriene klieren (bijnier, hypophysis, corpus luteum) Er is duidelijk synergismus tusschen de cortinewerking en vit. C Wanneer het vit. C gehalte vermindert staat dit gelijk met een verzwakking van de cortinewerking en omgekeerd cortineinsufficiëntie sleept na zich een C avitaminose. Er is ook een synergismus met het bijniermerghormoon (adrenaline).

Axerophtol daarentegen vernietigt na enkele uren ascorbinezuur (oplossingen met beide vitaminen zijn onwerkzaam). De plots chemische ontleding van ascorbinezuur wordt door lactoflavine sterk gecatalyseerd (verhinderd door glutathion). Vit. C be invloedt en bevordert de werking van fermenten (papaïne, cathepsine, arginase) andere worden geremd (amylase). Aminozuren worden "in vitro" gedesamineerd (omgezet tot aldehyden). Vitamine C is als de stof te beschouwen, zonder dewelke het steunweefsel geen samenhangende vezels kan vormen. Het zijn vooral de bindstoffen, het bindweef-

sel, kraakbeen, beenderen, tandbeen, bloedvaten en bloed, die afgestemd zijn op de aanwezigheid van vit. C.

Buiten de talrijke physiologische werkingen zijn nog vermeld de versnelling van de bloedstolling, de vorming van de onderscheidelijke bloedcellen, de vorming van antilichamen en de bloedbactericidie.

Bepalingsmethoden :

a) Biologische : zijn zeer specifiek maar veel minder nauwkeurig. Men gebruikt caviae (zie Suppt. B.PH.).

b) Chemische

Door titratie met oxydatie-reductieindicatoren. Deze zijn echter niet volkomen specifiek, en in het biologisch materiaal komen steeds reduceerende stoffen voor (glutathion, cystine, ergothionine, glucoreductonen, ferrozouten, looistoffen) die eveneens de gebruikelijke titratievloeistoffen 2.6 dichlorophenolindophenol of methyleenblauw reduceeren. Men kan ze nochtans verwijderen door behandelen met mercuriacetaat aan 20%, neerslaan van het mercuriion met H_2S, verjagen van H_2S door een stikstofstroom. Het biologisch materiaal wordt uitgetrokken met 20% trichlcorazijnzuur.
Als zuivere stof kan het ascorbinezuur iodometrisch bepaald worden.
Voor het onderzoek van zuivere vitamine C zie supplement der B.PH. blz. 1.

Internationale Eenheid :

De kleinste hoeveelheid ascorbinezuur die per dag moet worden toegediend om bij vit. C vrije voeding scheurbuik te verhinderen, is de cavia eenheid (= 0,5 mg. zuiver L. ascorbinezuur).
I Intern. eenheid : 0,05 mgr.

Voorkomen :

In alle levende plantaardige en dierlijke cellen, maar in veranderlijke hoeveelheden, weinig in vleesch, vet, koemelk, meel en brood. Maar vooral in versche groenten, fruit en aardappelen. Bij de toebereiding der spijzen is er gewoonlijk een aanzienlijk

vitamineverlies, door oxydatie, oplossing en koken.
Het maandenlang bewaren van aardappelen veroorzaakt een verlaging van 30 - 50% van het oorspronkelijk ascorbinezuurgehalte. Ook bij de conserveeringsbewerking van groenten is er een gehalteverlies, dat kan gaan tot 50%.

mgr. vit. C in 100 gr. versche stof.

gladiolensap	750 - 800
rozebottels	250 - 500
berk- en irisbladeren	240
paprika	150
peterselie	100
sinaasappel	65
citroen	45
sinaasappel- en citroensap	65

Aardappelen	10 - 20	spinazie	45
appelen	5 - 15	bloemkool	60
tomaat	2,5 - 25	mierikswortel	70
aardbeien	60	Ei, brood, gist	0
zwarte bessen	160	kaas	1
witte kool	50	melk	1,6
roode kool	46	rundernier	11
groene kool	87	varkenslever	25
rund- en varkensvl.	1,5	kalfslever	35

Het verbruik en de behoefte aan vit. C is zeer hoog en zou gemiddeld 50 mgr. per dag bedragen, met groote individueele verschillen. De vrouwenmelk is rijk aan vit. C, en tot aan een jaar blijkt het jong kind die te kunnen synthetiseeren.

Er zijn talrijke klinische toepassingen, te meer, daar er geen gevaar voor overdosing of nevenverschijnselen bestaat. Talrijk zijn de subklinische C hypovitaminose gevallen, veroorzaakt vooral door gebrek aan versche groenten, waarbij vit.C toediening zeer gunstig werkt. Andere aanwijzingen zijn bloedingen van aller aard en zelfs de gevallen van haemophilie; tegen griep gecombineerd aan kinine.

Penicilline :

De antibacterieele eigenschappen van schimmels waren reeds sedert 1929 door de proeven van Fleming bekend.
Toevallig kon hij opmerken dat op voedingsbodems met staphylococcus de bacteriegroei geremd was wanneer hierop schimmels (Penicillium) ontstonden. Hij onderzocht de afgezonderde voedingsbodems en kon hiervan de antibacterieele eigenschappen vaststellen.

Het onderzoek werd in 1940 in Oxford door Florey en anderen (Chain, Abraham, Raistrick) weer ter hand genomen.
Door extractie der voedingsbodem en reinigen door chromatographische adsorptieanalyse werd een stof geïsoleerd met een verbazend groote antiseptische werkzaamheid. Ze biedt het voordeel van ongschadelijk te zijn voor cellen, weefsels, de bloedbestanddeelen (de schadelijke dosis is duizendmaal zoo hoog als de curatieve dosis), en te werken in een verdunning die nagenoeg onafhankelijk is van het aantal bacteriën. De geconcentreerde oplossingen van Penicilline hebben geen invloed op ettercellen.

Bereiding van Penicilline en haar eigenschappen.

De stam is Penicillium notatum Fleming. Ze wordt gekweekt op een vloeibare voedingsbodem (Csapek - Dox) met glucose, zouten, phosphaten, gistextract bij 24°. Na acht dagen wordt de vloeistof afgescheiden, die na aanzuren geëxtraheerd wordt met aether (chloroform of amylacetaat). De aether op zijn beurt wordt met een waterige oplossing bij pH = 7 uitgetrokken. Het verder zuiveren blijkt zeer lastig te zijn omdat nog geen onoplosbaar zout (organisch- of metaalzout) of stabiele onoplosbare verbinding bekend is. Slechts de alcali- en aardalcalizouten zijn stabiel in een pH gebied van 5 à 7.

Sterilisatie door verwarming is niet mogelijk. Ook zware metalen zooals Cu, Zn, Cd, Hg, primaire alcoholen, ketonen, ammoniak, aminen, hydrazine, hydroxylamine, bisulfieten, H_2O_2, $KMnO_4$ desactiveeren de oplossing. Talrijke microörganismen beschikken over een ferment (penicillinase) die de penicilline ontleedt.

daarom is het noodzakelijk aseptisch te werken bij de cultuur der schimmels, de extractie en de bereiding van de penicilline-oplossingen.

De chemische constitutie van de zuivere stof werd nog niet gepubliceerd, en zal waarschijnlijk het uitgangspunt zijn voor de synthetische bereiding. De elementaire analyse van het bariumzout gaf als samenstelling : C : 44,3%, H : 4,8 %, N : 4,2 %, Ba : 22 %.

Door ontleding werden twee producten verkregen : penicillinamine en penicillinezuur.

Penicillinamine ontstaat door hydrolyse bij 100° met N/10 H_2SO_4 Het hydrolyseat geeft duidelijk de ninhydrine reactie en bevat 55 % van de totale stikstof als aminostikstof. Het penicillinamine wordt door $HgCl_2$ neergeslagen; na ontleding van het kwikzout verkrijgt men het kristallijnproduct met een opbrengst van 30 à 40%. Dit amine heeft geen rotatie, doet een intense blauwe kleur ontstaan met $FeCl_3$, geeft met p. nitrophenylhydrazine en osazon van glyoxal (tot 20%). Het gehalte aan penicillamine gaat parallel met gehalte zuivere stof in het uitgangsproduct en zijn antibacteriëele werking.

Het penicillinezuur wordt uit een zure oplossing bij een pH = 2 door butanol geëxtraheerd. Van het kristallijnzuur is de rotatie (α) Hg5461 : 600°, het verwekt geen blauwkleuring met $FeCl_3$, maar wel een duidelijke ninhydrinereactie.
De opbrengst is hiervan ook evenredig met de biologische werkzaamheid.

Beide hydrolyseproducten blijken dus wel de constituënten der penicilline te zijn. Penicilline zelf is een geel bruine stof die oplosbaar is in water(verdunde oplossingen zijn licht geel gekleurd).

De activiteit wordt uitgedrukt in Oxfordeenheden. Een O.E. is de hoeveelheid stof opgelost in 1 cm^3 water bij pH = 7 noodig om den groei van een bepaalde virulente staphylococcus geënt op 50 c bouillon volledig te remmen. Het zuiver kristallijnproduct bevat 1500 E/mg dus 1 E. = ± 0,65 γ.

De stof is onschadelijk voor den mensch of de muis, waaraan zelfs 20 mg. in de aders mag ingespoten worden. Leucocyten blijven tot een uur in leven in een 1% oplossing; de Staphylococcus daarentegen wordt geïnhibeerd in een concentratie van 1/50 millioen. Streptococcus in conc. : 1/625000; B. Neisser 1/2 millioen; B. anthracis, B.Tetani 1/1 millioen; ook werkzaam tegen gasgangreen, spirocheten (onwerkzaam tegen T.B.C., dysenteritis, Proteussoorten, Pyocaeneum). Penicilline werkt bacteriostatisch, niet bacteriocidisch (niet door dooding zooals de gewone antiseptica), ze wordt door het weefsel en den darm snel geabsorbeerd en de te snelle uitscheiding is een bezwaar bij de behandeling. Maag- en darmkanaal zijn echter niet de aangewezen weg omdat zuur van het maagsap en de darmflora het product aantasten. Men streeft naar een continue toediening (druppelsgewijs, intramusculaire, onderhuids, of intraveneus tot 100.000 O.E. in 100 à 500 cc. physiologisch serum dagelijks).

Penicilline komt nu gewoonlijk als tabletten van het Na of Ca-zout voor, waaruit aseptisch een sterieele oplossing bereid wordt. Zalven worden bereid met lanettewas en aardnootolie, bevattende 500 E./g.

Nog talrijke andere antibacterieele mucoïnen werden onderzocht (Flavicine, Gramicidine, Patuline, Streptothricine, notatine), geen enkel hiervan kon de werkzaamheid en de onschadelijkheid van Penicilline evenaren.

DE HORMONEN EN DE ORGAANPREPARATEN

Korte historiek en algemeenheden :

Claude Bernard had in 1851 de glycogenolytische rol der lever ontdekt en hij verklaarde hieruit dat er secreties in de organen ontstaan die in plaats van naar buiten te worden afgescheiden, rechtstreeks in het bloed overgaan. Van 1850 tot 1890 volgt de beschrijvende histologische periode. Men onderscheidde dan klieren met uitwendige secreties met afvoerkanaal (speekselklieren), van de gesloten klieren die geen afvoerkanaal bezitten (schildklier of bijnieren). Alleen afzonderlijke opmerkingen werden geuit, zoo beschreef Addison de naar zijn naam genoemde ziekte en Brown-Séquard had de physiologische gevolgen van de wegname van organen nauwkeurig waargenomen. Ook Vulpian had gevonden dat aderbloed dat uit de bijnieren komt, dezelfde groenkleuring verwekt met ferrichlorida als het mergweefsel van hetzelfde orgaan.
Brown-Séquard deed in 1889 voor het eerst de uitspraak dat klieren met inwendige secretie in het bloed stoffen afscheiden, dat alle weefsels een dergelijke afscheiding geven en als zoodanig solidair zijn de eene van de andere.

Groote ophef maakte in 1901 het isoleeren door Takamine en Aldrich van Adrenaline uit de bijnieren. Men bestudeerde afzonderlijk de eigenschappen van de zuivere stof wanneer ze in het bloed ingespoten wordt en van af 1905 ontstonden de hormonale theorieën.

Tot de 19e eeuw kende men vooral de zenuwachtige regulatie, de reflexen, de automatische reacties der spieren, klieren, en aders na het aanwenden van prikkelingen overgebracht door het zenuwstelsel. Met de endocriene functies komt een nieuwe regulatiewijze aan het licht : de chemische regulatie.
Het synergismus of de harmonie tusschen de organen is toe te schrijven aan scheikundige stoffen, de hormonen, die in het physiologisch midden rondgevoerd, op afstand werkingen gaan veroorzaken, die ze terzelfdertijd controleeren of reguleeren.

Een hormoon wordt dan wel gedefinieerd (ormao : ik wek op) als een scheikundige stof, in een klier afgescheiden die in het bloed overgaat en in aanraking met andere organen of werkzame cellencomplexen, op deze een specifieke invloed gaat uitoefenen. Als biocatalysatoren zijn ze ook werkzaam in zeer kleine dosen. Gley verklaarde terecht in 1920 dat alle hormonen endocriene stoffen zijn, maar dat alle endocriene stoffen niet noodzakelijk hormonen zijn. In tegenstelling met de vitamine worden ze in het lichaam zelf geproduceerd, maar dit is niet steeds een essentieel verschil (bijv. vit D). De biotine kan door bepaalde schimmels niet gesynthetiseerd worden, maar ten duidelijkste zijn ze wel hormonen voor andere schimmels. Bij groene planten, die zelf alle vitaminen kunnen synthetiseeren zou van vitamine in het geheel niet gesproken kunnen worden, maar nochtans kan de toediening van pantothenzuur van groot voordeel zijn bij de snelle ontwikkeling van de plant (ergonen).
Van uiterst groot belang zijn hiervoor de auxinen als groeihormonen.

Een kenmerk van een hormoon is zijn specificiteit. Wanneer de scheikundige bij de extractie van endocriene klieren een of meer werkzame bestanddeelen isoleert, met een wel bepaalde invloed op het organisme dan is het dikwijls moeilijk "à priori" te verklaren welke stof wel de eigen activiteit van de klier vertegenwoordigt. Het kunnen ook stoffen zijn die ontstaan bij de extractiebewerkingen en een analoge of zeer partieele werking uitoefenen; soms kan het een werking zijn die weinig verband heeft met de specifieke invloed van de klier, Daarom poogde Gley drie voorwaarden te stellen aan de indeeling bij de endocriene klieren :

1. Het orgaan dat het hormoon produceert moet een klierstructuur en de histologische bijzonderheden ervan hebben.
2. Een bepaalde chemische stof moet aantoonbaar zijn in de produceerende klier en teruggevonden worden in het bloed dat de klier doorstroomt en het slagaderbloed (algemeene bloedbaan).
3. Het bloed dat uit de klier komt moet een bepaalde physiologische werking hebben, die waarneembaar is door inspuitingen in de circulatie van een ander dier.

De hormonen ontstaan onder neurogenen invloed. In het bloed afgescheiden vormen ze een verbinding tusschen de zenuwprikkel en de uitwerking.
De door de hormonen in het lichaam bewerkte regulaties zijn gecoördonneerd met de regulaties van het zenuwstelsel. Nochtans zijn beide gansch onafhankelijke systemen, al staan ze wel wederzijds in verbinding, zoo dat de functie van de eene zonder die van de andere niet mogelijk is.

Op grond van de afhankelijkheid der hormoonproductie van het zenuwstelsel kunnen we snel of langzaam verloopende hormoonwerkingen onderscheiden.

Snelwerkende hormonen zijn die der hypophyse achterkwab het bijniermerg (talrijke sympathische zenuwcellen met embryologisch, histiologisch en physiologisch verband met het klierweefsel (dat adrenaline uitscheidt in het bloed).

Het zenuwstelsel is hreguleerend systeem der snel verloopende functies, en om deze redenen ook reguleeren deze hormonen,die ontstaan in de endocriene organen, die tot het zenuwstelsel behooren, ook snel verloopende functies. Het zenuwstelsel schept in zijn gezamenlijkheid de normale physiologische toestand van de organen. De hormonen zijn de regulatoren van deze toestand, daar ze door in evenwicht brengen van hyper- en hypofuncties het rechthouden van de gewenschte normaaltoestand verzekeren.

De hormonen als regulatoren hebben zelf een regulator en deze is de hypophysis voorkwab, die de ontwikkeling, den toestand en de functie van de gezamenlijke andere inkretorische organen, en dus de gezamenlijke stofwisseling regelt. De hypophysis wordt dan soms bestempeld als "de dirigent van het hormonaal orkest". Rechtstreeks ondergaan de endocriene klieren ook de nerveuze invloeden vanwege het vegetatief zenuwsysteem. Steeds bevatten ze talrijke sympatische en parasympathische vezels.
Het centrum der zenuwregulatie van het incretorisch systeem ligt in de middenhersenschors; die met de hypophysis in nauwe functioneele verbinding staat.

Men onderzoekt de rol en de werking der hormoonorganen door wegname van de betrokken klier en waarneming van de uitvalsverschijnselen. Uit de geëxtirpeerde klieren vervaardigt men dan extracten die met de meest verscheidene methoden dan verder gezuiverd worden tot het werkzaam bestanddeel in hande gekregen wordt. Van de geïsoleerde stof heeft men dan verder maar de structuur op te helderen. De hormoonwerkingen kunnen ook bestudeerd worden door toediening van klierextracten of zuiver hormonen. Men mag hier slechts dan werken met physiologische en niet met toxische- of pharmacologische dosissen. Veel hulp wordt bij het onderzoek geboden door het histologisch onderzoek. Dit geeft een beeld van de functioneele toestand van een klier; door histochemische methode kan ook worden uitgemaakt in welk gedeelte of welke cellensoort van de klier het specifiek hormoon gevormd wordt.

Hier beschikt men echter niet zooals bij de vitaminen over nauwkeurige chemische bepalingsmethoden : slechts dierproeven geven hier uitkomst. De werkzaamheid wordt dan zooveel mogelijk in als mg of γ van een zuivere standaard gedefinieerde eenheden uitgedrukt.

Nu reeds veel bekend is over de chemische structuur der hormonen, heeft men ze willen indeelen in twee groepen : dr proteohormonen en de niet proteinachtige hormonen. De proteohormonen (insuline, bijschildklier, hypophysiohormoon), zijn zeer gevoelig tegen alle mogelijke chemische of physische factoren. Ze worden als eiwitten door de fermenten van het maag- en darmkanaal verteerd en kunnen dus slechts injectorisch toegediend worden. Als eiwitten zijn ze tevens zeer gevoelig aan denaturaties. De niet proteïnachtige hormonen, zijn daarentegen veel meer stabiel, en kunnen gewoonlijk ook peroraal toegediend worden (steriden).

Naast de eigenlijke hormonen die slechts in bepaalde klieren gevormd worden (glandulaire hormonen) heeft men ook weefsel- of aglandulaire hormonen) willen onderscheiden. Deze stoffen zouden hun werking ontwikkelen in de omgeving zelf waar ze gevormd worden. Doordat ze op velerleiplaatsen kunnen ontstaan, zijn de uitvalsverschijnselen dan ook zeldzaam aan te treffen, en ook moei-

lijk experimenteel te bewerken. Hiertoe behooren de neurohormonen, die bij zenuwprikkeling vrij worden, bijv. de acetylcholine en de sympathine die ontstaan na prikkeling van de sympathische zenuwcentra. Onlangs heeft men nog willen onderscheiden de celhormonen (cytohormonen) die zouden gevormd worden en werkzaam zijn binnen in de cel zelf. Hiertoe rekent men nog de regulatoren der eencellige dieren, de wondhormonen (necrohomonen) die na etsing de cel verlaten en de regeneratie bevorderen.

We kunnen nog even aanstippen dat de invloed van buitenfactoren op de physiologische functies (bv. temperatuurveranderingen, licht, emotioneele invloeden, enz.) via de hormonen gebeurt. Meer en meer blijkt bij den mensch het vegetatief systeem beperkt, en de zenuwachtige beïnvloeding neemt met de functioneele complexiteit van het organisme en zijn hoogere intellectueele ontwikkeling toe.

De Schildklier. Thyroïdeum siccum :

De schildklier weegt 30 à 60 g. en is samengesteld uit twee amandelvormige kwabben, vereenigd met een smalle verbindingsbuis (isthmus), en hangend voor de trachea. Deze kwabben zijn omringd door twee omhulselvliezen. De klier zelf is gevormd uit hoofdkwabben en kwabjes, ingesloten in deze vindt men de follikels of blaasjes, bestaande uit epitheelcellen bevestigd op een menbraanbasis. Deze blaasjes zijn omgeven door het bindweefsel waarin steeds talrijke bloed- en weivaten voorkomen. Ieder follikel bevat colloïdaal materiaal ("het kolloïd") afgescheiden door de epitheelcellen.

Men neemt aan dat deze kolloïde stof, wanneer noodig, in het follikel door de epitheelcellen terug opgeslorpt wordt, en van hier uit in de haarvaten en de lymphevaten, die de follikels omringen, overgaat. Dit kolloïd zou het hormoon bevatten. De diameter der klierblaasjes of follikels bedraagt ongeveer 100 μ.

De schildklier bevat talrijke minerale bestanddeelen en gemiddeld iets meer dan 0,2 % Jodium. Dit jodium-gehalte is echter

onderhevig aan groote wisselingen in verband met de diersoort en de ouderdom (bv. bij het paard van 0,025 tot 0,9%).

Dit gehalte is ook zeer veranderlijk bij het rund en varken, maar meer constant bij het schaap. Ter bereiding van het officineel schildklierpoeder worden de kwabben uit het versch geslacht dier (schaap), van bindweefsel en vet bevrijd, in schillen gesneden of met het machien fijngehakt, en in het vacuum aan een temperatuur lager dan 50° snel gedroogd. Daarna wordt het materiaal tot ruw poeder gebracht, met aether of petroleum aether ontvet en daarna weer volledig gedroogd. Een deel poeder moet ongeveer overeenkomen met vijf deelen versche klier en minstens 0,200 % organisch gebonden Jodium bevatten. Het watergehalte moet kleiner zijn dan 6 %, en het aschgehalte kleiner dan 5%.

Onderzoek van schildklierpoeder of andere orgaanpoeders.

Aan orgaanpoeders worden soms vreemde stoffen toegevoegd met als doel :

1. de bewaring, gedurende het vervoer of de stockeering, mogelijk te maken. Daar ze steeds versch moeten gebruikt worden mogen in geen geval conserveermiddelen hieraan vermengd worden.
2. het drogen of het verpulveren te bevorderen (suiker, zetmeel, houtzaagsel, magnesiumoxyde).
3. het gewicht ervan te verhogen (bariumsulfaat, krijt, enz.).

De poeders moeten steeds in droge flesschen, best met kalkstop of geparafineerde stop, bevrijd van vochtigheid en licht, bewaard worden. De bepaling van de vochtigheid is steeds belangrijk omdat vochtige orgaanpoeders zeer snel bederven en hun werkzaamheid verliezen. Men werkt op 5 gr. en behoudt dit minstens 6 uur aan 105°. Zeer vaak neemt men waar dat het vochtgehalte tot 12 à 15 % kan bedragen.

Ter bepaling van suiker worden 4,5 g. droog poeder in 90 cm^3 kokend water geleidelijk gebracht en men laat het koken enkele minuten aanhouden. Men filtreert warm op eenBüchnerfilter en wascht de niet oplosbare rest met enkele cm^3 water. De rest wordt met water gewreven, opnieuw in suspensie gebracht met water ($40 cm^3$)

en opnieuw afgezogen. De gezamenlijke volumina worden op 150 cm^3 gebracht en men zoekt de reduceerende suikers, voor en na hydrolyse met HCl of H_2SO_4 op het waterbad, op. Men doseert met de methode van Bertrand.

Daar formaldehyde het meest gebruikte conserveermiddel is, zal men het speciaal opsporen. In een kolf brengt men 5 gr. poeder, 100 cm^3 water met wat zwavelzuur. Men destilleert over in een stroom van kooldioxyde (ter verhindering der oxydatie) 30 cm^3 filtraat worden opgevangen, waaraan 1 cm^3 zwavelzuur 1/4 en 1 c fuchsineoplossing, ontkleurd met natriumhydrosulfiet, toevoegt.

Formol verraadt zich door een roodviolette, daarna blauwe kleur. De deugdelijkheid kan ook worden nagegaan door een reactie op peroxydasen, die vernietigd worden door het blootstellen aan te hooge temperatuur of behandeling met warme alcohol.

Men macereert 1 gram poeder een half uur met 10 cm^3 water, daarna filtreert men en bij 5 cm^3 van het filtraat voegt men 10 cm^3 eener versch bereide guajakoplossing in alcohol en 7 druppels waterstofperoxyde aan tien volumina. De oxydasen worden door een blauwe kleur waargenomen. De B.Ph. laat ook vaststellen dat het eiwit niet gecoaguleerd werd bij de verwarming, en laat salicylzuur als conserveermiddel met behulp van ferrichloride opsporen (zie blz. 550).

Het microscopisch onderzoek van de orgaanpoeders is een zeer nuttige bewerking, die eveneens toelaat vervalschingen en bijmengingen zeer nauw waar te nemen.

Men herkent in het microscopisch preparaat als normale elementen : groote hoeveelheden glanzende stukken kolloïd, dan in geringere hoeveelheden epitheelcellen, de elementen van het interlobair weefsel (kleine cellen met onduidelijke wanden), stukjes vezel, bloedvat, zenuwvertakkingen.

Het jodiumgehalte van het klierpoeder wordt chemisch bepaal na destructie van de organische stof (Zie B.Ph.). De bepaling geeft een overzicht van de degelijkheid maar echter nog niet van de physiologische werkzaamheid die slechts biologisch kan geijkt worden (zie verder).

De physiologische werking van de schildklier :

De schildklier regelt de intensiteit der stofwisseling in het gezamenlijk organisme. Ze bepaalt de omzetting aan eiwit, koolhydraat en vet en het gezamenlijk basaal metabolisme. De algemeen rol bij de stofwisseling der cellen blijkt uit de groote bloeddoorstrooming, die op 100 gr. orgaan 560 cm^3 per minuut bedraagt (nieren slechts 100 cm^3, spier in rust slechts 12 cm^3). Zoowel de normale als de verminderde stofwisseling wordt door de schildklier verhoogd. Er is :

1. verhooging van de totale omzetting,
2. toename van de specifieke dynamische werking van de voedingsstoffen
3. vermindering van het nuttig effect van de arbeidsstofwisseling.

Dezelfde arbeidsverrichting vergt bij de met schildklierhormoon behandelde dieren een grooter calorieënverbruik dan bij de normale dieren. Er is dus vermindering van het lichaamsgewicht en sneller afbraak van de reservestoffen. De hyperfunctie der schildklier of het toedienen van schildklierpreparaten van het basaal metabolisme in een verhouding van 100 à 200% verhoogen. De lever verliest in hooge mate haar glucogeenvoorraad. De stikstofomzet wordt verhoogd met vermeerderde afscheiding van ureum creatine en creatinine in de urine; ook het zuurstofverbruik is grooter. Het vetverlies der spieren bedraagt tot 70%, dat der lever tot 30 %, en er is remming van de omzetting van koolhydraat in vet.

De lichaams- en de huidstemperatuur is verhoogd. Bij lage werveldieren is het hormoon niet alleen van belang voor den groei maar ook voor de differentiatie der weefsels. Het toedienen van thyroxine aan dikkoppen verwekt een voortijdige metamorphose. Zelfs is het mogelijk de dieren boven de normale natuurlijke grens te ontwikkelen. Door toediening van thyroxine aan de axoloth verdwijnen de kiemen; de longen ontwikkelen zich en de zwemstaart neemt een ronde vorm aan. Van waterdier gaat het over naar een landdier dat niet meer in het water kan ademen.

Het schildklierhormoon onderscheidt zich van de andere hormonen door het langzaam inzetten der werkzaamheid. Zelf bij intraveneuze inspuitingen blijft de werking soms eerst nog dagen uit, alvorens aan te vangen. Ze duurt dan ook soms langer en steeds bestaat een zeker gevaar voor cumulatieve werking.

De werkzaamheid der schildklier zelf wordt hormonaal geregeld door het thyreotroop hormoon de hypophysis voorkwab en nerveus door het sympathisch systeem. De actieve klier kenmerkt zich histologisch aan de ontwikkeling van het epithelium en de kolloïd geledigde follikels; wanneer de klier in rust is blijkt het epithelium platgedrukt en de follikels zijn gezwollen en met kolloïd gevuld. De functioneele toestand van de schildklier krijgt ook zijn weerspiegeling in het jodiumgehalte van het bloed. Van een normaal gehalte van 10 à 15 γ % kan door hyperfunctie der klier dit gehalte met 200 % toenemen. Een dysfunctie van de schildklier leidt ook tot stoornissen in alle andere hormoonorganen, vooral in de hypophysis en geslachtsklieren.
Hyperthyroïdie en overtollige hormoonafscheiding in het bloed veroorzaakt de Basedowziekte met als symptomen : tachycardie, exophtalmus, verhoogde basale stofwisseling, glucosurie, zenuwachtigheid, gejaagd voorkomen, zweten, nijging tot dyspnoe.
Hypothyroïdie geeft verlaagde stofwisseling, neiging tot vetafscheiding, droge huid, haaruitval, gevoeligheid voor koude, geringe werklust, traagheid, hypo- of amenorrhee, verhooging van het cholesterolgehalte van het serum en van tolerantie voor koolhydraten. Voor kinderen is kenmerkend het achterblijven van groei en geestelijke ontwikkeling, vertraagde ossificatie of puberteit (myxoedeem of cretinisme).

Het kan zijn :

1. een ontwikkelingsremming; of
2. een schildkliergebrek op hooge leeftijd.

Vergrooting van de schildklier of struma kan evenwel een hypo- als een hyperfunctie zijn.

Chemie van de schildklier :

Bij het eerste onderzoek van Baumann bleek het jodium der klier aan een eiwitachtige stof (globuline) gebonden te zijn, die in een NaCl-oplossing geëxtraheerd kon worden. (Iodothyroglobuline). Dit bleek geen enkelvoudige verbinding te zijn.

Later in 1919 publiceerde Kendall een methode ter isolatie van het werkzaam hormoon : de thyroxine. Hij extraheerde in alcalisch milieu en sloeg neer met zoutzuur, in oplossingen met toenemend alcoholgehalte. Door extractie met bariet verbeterde Harington de methode en bewees de constitutie van thyroxine door ze ook langs synthetischen weg te bereiden.

Het is de dijodo-p oxyphenylaether van dijodotyrosine :

Thyroxine kan niet volledig de werking van de geheele schildklier vervangen; ze blijkt gedeeltelijk haar werkzaamheid te verliezen wanneer ze per os wordt ingenomen, terwijl de schildklier peroraal toegediend, wel haar volle werkzaamheid behoudt.
De L. thyroxine is driemaal meer werkzaam dan het racemisch stelsel. Ze is slechts in alcalisch midden oplosbaar.
De dijoodtyrosine is een, bij de vorming van thyroxine, optredend tusschenproduct; ze zou een antagonistische werking hebben en het verhoogd basaal metabolisme teneerdrukken.

Biologische bepalingsmethode :

1. Caviamethode :
Caviae van 250 à 300 g. worden op gelijke wijze gevoed en afgezonderd; bij toediening van schildklierpreparaten is er gewichtsverlies. De caviaeenheid is die hoeveelheid welke na 7 dagen een gewichtsverlies van 10% bij 75% der proefdieren heeft verwekt.

2. Glycogeenmethode :
Men bepaalt de vermindering van het glycogeengehalte in de lever bij ratten en muizen.

3. De acetonitrielmethode (Reid Hunt)
Thyroxine verhoogt het weerstandvermogen der muizen tegenover verschillende giften, en nl acetonitriel. De graad der weerstandstoename (verhooging der minimale letale dosis) is binnen bepaalde experimenteele grenzen, evenredig met de hoeveelheid werkzame schildklier.

4. De metamorphosetest :
De gedaantewisseling der dikkoppen wordt versneld wanneer thyroxine of een schildklierpreparaat aan het water van het aquarium toegevoegd wordt. Zelf tot een verdunning van 1/10 millioen is de versnelling waarneembaar. In plaats van dikkoppen kunnen de axolothen ook gebruikt worden. Een axoloth eenheid is de geringste hoeveelheid die dagelijks moet worden toegediend om binnen de vier weken een volledige metamorphose te verwekken; die stemt overeen met gemiddeld 1 γ thyroxine en men noemt het de hormooneenheid.
De klinische toepassingen zijn alle gevallen van hypothyreose en vetzucht.

De normale dosis voor de orgaanpreparaten is 1 à 3 maal daags 0,01 g. tot 0,5 g. (liefst niet meer dan 1,0 g. per dag; maximale dosis : 1-2 g. na tien dagen moet de behandeling tijdelijk onderbroken worden. Van het hormoon thyroxine gebruikt men tabletten van 0,2 à 1,0 mg. of ampullen van 1,1 cm^3 aan 1 $^0/_{00}$.
Hier meer dan ooit moet de behandeling onder toezicht van een arts gebeuren.

De bijschildklieren : glandulae parathyroïdeae.

De schildklier is omgeven door twee omhulsels, waarvan het uitwendige omhulsel gehecht is aan de trachea.
Onder dit buitenste omhulsel komen bij den mensch vier kleine ovale lichaampjes voor, van ongeveer 0,15 g. gewicht, twee aan twee op de achterzijde en op het epitheelweefsel verspreid.

Van het inwendig omhulsel dringen fijne bindweefselvezels in het orgaan binnen. Dit laatste is vooral samengesteld uit groepen epitheelcellen, d[illegible] bindweefsel gescheiden; tusschenin liggen talrijke bloedvaten. Deze epitheelcellen zijn van drieerlei aard. Het zijn vooral kleine, zich helder kleurende hoofdcellen, polyedrisch en met een ronde blaasvormige kern en nucleool. Vanaf het zevende jaar bij den mensch ontstaan grootere cellen, die meer kleurbaar zijn, gevuld met oxyphiele korrels, kleurbaar met eosine; minder talrijke zijn de donker[illegible] hoofdcellen met een fijnkorrelig protoplasma, dat zich slechts zwakjes met eosine kleuren laat.

De werking werd ontdekt naar aanleiding van de osteïtis fibrosa waarbij een hypertrophie der kliertjes opgemerkt werd. De uitval leidt tot daling van het Calciumgehalte van het bloed, verhooging van het anorganisch phosphorgehalte.

Gepaard hiermede is een overmatige gevoeligheid van de motorische zenuwen en spieren voor mechanische en electrische prikkels met als gevolg tonische en clonische krampen en tetanie. Een zuiver hormoon kon niet uit de klieren geëxtraheerd worden. Het hormoon is niet dialyseerbaar, en haar werkzaamheid wordt vernietigd door hydrolyse met zuren, alkalihydroxyden, proteolytische fermenten. De verkregen preparaten bevatten geringe hoeveelheden ijzer, gemiddeld 0,2 % zwavel, en geen phospho[illegible].

Volgens Collips is het een proteïne met een isoëlectrisch punt bij pH 4,8 - 4,9, oplosbaar in water aan beide zijden van dit punt, in zure oplossing volledig neergeslagen door op de helft verzadigen met ammoniumsulfaat of verzadigen met natriumchloride. Het is ook oplosbaar in alcohol aan 80°, onoplosbaar in absolute alcohol, aether, aceton en pyridine, niet dialyseerbaar.

De extracten worden bereid naar de werkwijze van Tweedy : 100g. kleingesneden klieren worden met 200 cm^3 3% HCl, 20 minuten aan 70° geëxtraheerd, Na afkoeling wordt het vet afgescheiden en men filtreert. Aan het met natriumhydrox. geneutraliseerd filtraat voegt men een gelijke volume aceton aan toe en laat in de ijskast overnachten. Na filtratie wordt weer tot op 1/3 van het volume verdampt. Weer wordt nu trichloorazijnzuur aan toegevoegd ter neutralisatie en tot een eindconcentratie van 2,5 %.

Het neerslag wordt afgecentrifugeerd, met alcohol gewasschen en in een exsiccator gedroogd. De massa wordt in een Soxhletapparaat met chloroform uitgetrokken. Men verkrijgt dan als rest een grauw amorf poeder, met een opbrengst van 1,0 à 2,0 mg. per kliertje van een os.

Standaardisatie: (Collips)

Men gebruikt jonge honden, van ongeveer 20 kg., nuchter van 24 uur . 1 Collipseenheid is 1/100 der dosis die bij honden van 20 kg. onderhuidsch ingespoten, binnen de 15 uur een toename van het calciumgehalte van het bloedserum van gemiddeld 5 mg.% veroorzaakt.

De handelspreparaten zijn oplossingen voor inspuiting die gewoonlijk 20 à 25 Collipseenheden per cm^3 bevatten, ofwel zijn het dragées met 0,0065 g. droge klier. De contrôle van de bloedcalciumspiegel moet samen doorgaan wegens het gevaar van overdoseering.

De thymus :

De thymusklier bedekt ook in u-vorm den slokdarm. Ze is het meest ontwikkeld bij jonge individuën, vooral van af het tweede jaar tot de puberteit. Daarna vermindert ze in omvang en ondergaat vetontaarding, zonder heelemaal te verdwijnen.
Ze oefent een belangrijke invloed uit op de voeding en de bloedvorming van het kind (wegneming, leidt tot rachitis, en vaak tot dood).

Bouw van het orgaan :

In het orgaan onderscheidt men talrijke kwabjes, die samengesteld zijn uit een buitenste schorsgebied en een centrale mergzone, die lichter van kleur is. De mergzones der kwabjes staan onderling in verbinding en vormen zoo een samenhangend gebied voor de geheele klier. Dit merg bevat de talrijke reticulumelementen en thymocyten en tevens de lichaampjes van Hassall (ontaarde, cirkelronde, ontaarde kernlooze cellen, gerangschikt als de bladen van een ui).
Deze lichaampjes nemen in aantal toe met den ouderdom van het individu.

Men heeft uit de thymusklier nog geen hormoon geïsoleerd, daar overigens ook nog geen bruikbare test gevonden werd.
De physiologische werkingen door verschillende auteurs met thymusextracten waargenomen zijn uiteenloopend of verschillend, en soms aan niet specifieke medegaande stoffen toegeschreven.
Bij rattenverhoogt den groei, wordt de geslachtsrijpheid versneld, alsook de worpgetallen, het gemiddeld gewicht en de ontwikkeling der jongeren.

Men gebruikt de geheele klier in poedervorm, of soms geeft men de voorkeur aan een waterig extract. Om dit te bereiden wordt 1 kg. versche thymus gedurende 24 uur met aceton behandeld, en na verwijdering van deze, ook nogeens met aether.
De rest wordt dan 24 uur lang met water uitgetrokken, en het waterig extract in het vacuum verdampt tot droog. De rest wordt in 3 l. water terug opgelost. Door verwarming en toevoeging van azijnzuur wordt het eiwit neergeslagen. Uit het filtraat wordt door indamping in het vacuum de werkzame stof verkregen.

Van de epiphysis, corpus pineale, de pijnappelklier is de inwendige secretie nog evenmin bekend. Het is een kleine klier aan de basis van de hersenen, die haar maximale grootte bereikt in den ouderdom van 7 tot 10 jaar.
Bij den volwassene is zij een klein rond lichaampjes, zoowat half zoo groot als de hypophysis, rond en eivormig.
Het bindweefsel verspreidt zich over de geheele klier en de verscheidene weinig afgeteekende kwabben. Daarin liggen twee soort cellen, de neurogene cellen en de talrijke kliercellen.
De klierafscheiding is niet onmisbaar voor het leven, ze zou een remmende invloed uitoefenen op de ontwikkeling van het ovarium en de teelbal.. Het wordt soms bij pubertas praecox toegepast.

Insuline :

Insuline is de inwendige secretie der pancreasklier die afgescheiden wordt aan de Langerhanssche eilandjes (moeilijk kleurbare cellen, zonder zymogene korrels). Bij den mensch maken deze cellencomplexen 1 à 3 % uit van de pancreas, met een diameter van 50 à 500 μ. Ze bezitten geen afvoerkanaaltjes, wel talrijke bloedcapillairen en zenuwvezels die gedeeltelijk in verbinding staan met den vagus.

De suikerziekte, diabetes mellitus was sedert de oudheid bekend en sedert 1893 wist men dat ze kan beholpen worden door een stof uit de alvleeschklier. Door klierwegneming kon men glucosurie bij den hond verwekken en men trachtte deze experimenteele pancreasdiabetes te genezen door toediening van pancreasweefsel of extracten. Dit leidde tot geen resultaat omdat de preparaten per os waren toegediend en men kwam langzamerhand tot de vaststelling dat het werkzaam bestanddeel door de uitwendige secretie van de pancreas (trypsine) afgebroken wordt.
Scott kwam tot een veel duidelijker positief resultaat door afbinden van het afvoerkanaal (het zymogeen weefsel was dan vernietigd of zeer arm aan pancreatine) en hypodermisch toedienen van het extract.

Paulesco in Frankrijk, maar vooral Banting en Best (1921) in Toronto verwezenlijkten extracten uit de afgebonden alvleeschklieren van foetussen waar de eilandjes grooter zijn en het fermentapparaat nog niet zoo ontwikkeld is als bij volwassen dieren.
Zij deden de extractie in zuur milieu waardoor de trypsine onwerkzaam was. De systematische studie bracht tot de zekerheid dat de hypoglycemische werking moest worden toegeschreven aan een werkzaam bestanddeel : de insuline.

Bereiding van insuline :

Er zijn talrijke extractiemethoden, waarbij meestal gewerkt wordt met aangezuurde alcohol. Men gaat bijv. op de volgende wijze te werk : de van vet bevrijde alvleeschklier van rund, varken en schaap wordt gemalen en 12 uur in aanraking gebracht in

de koude met een volume, door azijnzuur aangezuurde, alcohol aan 95°. Daarna wordt de massa afgecentrifugeerd en het filtraat wordt behandeld met sterke alcohol tot een alcohol graad van 80.
Het neerslag dat ontstaat wordt verworpen, daar de insuline oplosbaar is. De oplossing wordt in het vacuum beneden 30 à 40° verdampt; de rest wordt met aether geëxtraheerd en terug behandeld met alcohol aan 80°.
Men filtreert en slaat daarna de insuline neer met een groote overmaat alcohol.

De drie voornaamste methoden ter aanzuivering van de insulineextracten zijn de uitzouting door voor de helft verzadigen aan ammoniumsulfaat of door natriumchloride of natriumsulfaat, aan een pH nabij 5,0. Het isoëlectrisch punt van ruwe insuline ligt tusschen 4,7 en 5,7.

Abel gelukte het eerst insuline onder kristallijne vorm te verkrijgen. Door herhaalde kristallisaties is men er in geslaagd een stof te bekomen die voldoet aan het criterium van een zuiver chemische individu en waarvan door de herhaalde kristallisaties noch de physische of chemische eigenschappen veranderen, noch de physiologische werkzaamheid toeneemt.

Chemische eigenschappen :

Insuline is een proteïne waarvan het moleculair gewicht 35.000 bedraagt en met een positieve ninhydrine, biureet, xanthoproteïne en Millonreactie.

Ze kristalliseert onder vorm van rhomboëders, smeltend aan 233° met ontleding. Ze is oplosbaar in zwakke zuren en zwakke alcaliën, en in alcohol aan 80 %, onoplosbaar in organische oplosmiddelen, niet dialyseerbaar, met een linksche optische rotatie. Ze bevat een vrij hoog zwavelgehalte (3,15%).

Door hydrolyse worden uitsluitend aminozuren verkregen : cystine 12%, tyrosine 12%, glutaminezuur 21 %, leucine 30% arginine, lysine, histidine, geen tryptophaan.
Het isoëlectrisch punt van de zuivere stof bedraagt 5,3.
Het hormoon wordt gehydrolyseerd door proteïnasen zooals pepsine en trypsine. Als droog poeder is de stof maandenlang opgelost in

N/100 HCl jarenlang houdbaar. Ultraviolet licht, oxydeerende en reduceerende stoffen kunnen ze nochtans vlug ontleden. Door azijnzuur ontstaat acetylinsuline, die slechts 1/5 der werkzaamheid meer heeft, maar door geleide verzeeping kan de oorspronkelijke activiteit terug verkregen worden.
Zoowel als die acetyleerbare groepen, zijn de disulfide- en de carboxylgroepen voor de physiologische werkzaamheid van essentieel belang. De eigenlijke chemische structuur is, zooals voor de andere eiwitten, nog onbekend.

Physiologische werking :

Insuline regelt de koolhydraatstofwisseling : de glucose in de lever en de spieren wordt tot glycogeen gecondenseerd en de bloedsuiker zelf bevordert de insulineafscheiding van de pancreas. Een maaltijd met een rijk gehalte aan koolhydraten of een parenterale toevoer van glucose verwekken een insulineafscheiding in het bloed die het bloedsuikergehalte beneden het normaal peil brengt. Het kan zelfs zoo ver gaan dat een teveel aan insuline het suikergehalte nog lager dan 0,100 % brengt.
Adrenaline heeft een omgekeerde werking en verwekt hyperglycaemie (antogonismus). Het evenwicht stelt zich op een met de diersoort veranderlijk niveau in (bodemvisschen : 0,023%; zoogdieren 0,100%; vogels met 6 à 20 vleugelslagen per seconde : 0,200 %; bijen uit 200 vleugelslagen per seconde : 2,000 %).

Er is geen zekerheid aangaande de hormonale regulatie van het eilandjesorgaan door een pancreotroop hormoon in de hypophysisvoorkwab, al lijkt dit wel waarschijnlijk.

Op de industrieele schaal kan men uit 100 kg. varkensalvleeschklier, 10 g. zuivere insuline verkrijgen.
Bij de gezonde mensch bevat de alvleeschklier 2 I.E. per gram, bij diabetici slechts 0,4 I.E. Insuline werkt zeer snel en reeds één à twee uur na de inspuiting vermindert de hypoglycaemische werking. Dit is een bezwaar bij de therapeutische toepassing, daarom geeft men de voorkeur aan de onoplosbare combinatie met protamine (zie verder).

De werkzaamheid van insuline hangt af van de soort voeding. Konijnen gevoed met graanvoeder zijn voor insuline gevoeliger dan diegene die met haver (zure voeding) bedeeld worden.
Ratten met koolhydraatarme kost reageeren op parenterale insuline veel zwakker dan dieren met veel koolhydraat gevoed, (minder krampen). Bij eenzijdige vet- en eiwitvoeding zijn de eilandcellen practisch onwerkzaam. Plotse toevoer van koolhydraten verwekt een sterke en langdurige bloedsuikertoename. Afwijkende bloedsuikerkrommen na suikerbelasting zijn niet steeds aan een klierbeschadiging te wijten, maar kunnen een voedingsoorzaak hebben; bovendien is er dagelijks een rhythmische glycogeenfixatie en glycogeenvrijwording in de lever.

IJking :

Men bepaalt de bloedsuikerverlaging bij het konijn, en nl. de hoeveelheid insulinepreparaat die de bloedsuiker bij subcutane inspuiting na twee uur tot aan 0,045 % verlaagt. Men neemt 12 dieren van [illegible] Kg., nuchter sinds 18 à 24 uur en verdeelt ze in twee reeksen van zes. Aan de eerste reeks wordt resp. 1 I.E. van een standaard preparaat ingespoten, aan de tweede reeks een hoeveelheid die ook ongeveer overeenstemt met 1 eenheid.
Alle uren bepaalt men het glucosegehalte in 0,1 cm^3 bloed afgenomen aan de oorvena, met de methode van Hagedorn-Jensen.

In plaats van zich te beperken tot een bepaling na twee uur, blijkt het meer doelmatig de bepaling om het uur gedurende vijf uur te doen. Men neemt dan het gemiddelde hiervan en berekent hieruit de gemiddeld procent. bloedsuikerdaling voor elk der twaalf konijnen. De volgende dag worden de twee reeksen omgewisseld en wordt het onbekende preparaat aan de zes konijnen ingespoten die den dag te voren met den standaard behandeld werden en omgekeerd. Men neemt dan de som van de gemiddelde procentische bloedsuikerdaling van de reeks van de standaardinsuline en die van het onbekend preparaat. Bij gelijkheid wordt geconcludeerd dat dit laatste ook een eenheid bevat. Is er geen gelijkheid dan wordt op de [illegible]. Wanneer dan het verschil tusschen beide uitkomsten niet grooter is dan 20%, kan de evenredigheidsregel

worden toegepast. In alle geval is na de verdunning een nieuwe volledige contrôle weer aan te raden.

De B.Ph. geeft als voorschrift de grootste vermindering der glycaemie vijf uur nadien te bepalen. Hiermede is waarschijnlijk bedoeld de grootste bloedsuikerverlaging van de vijf bepalingen die om het uur verricht worden. Ze schrijft nog een tweede goedkoopere, maar minder nauwkeurige, methode voor : de bepaling van de noodige dosis om stuipen of collapsus te verwekken bij de helft van een reeks witte muizen aan 37°. Bij onderhuidsche inspuiting van 1 cm^3 eener 10 % glucoseoplossing moeten de stuipen dan ophouden. De B.Ph. houdt zich ook nog aan het vroeger standaard preparaat dat 8 Int.Eenheden per mg. bevat. Nu wordt meestal als interneteenheid 1/24 mg. van de zuivere kristallijne insuline aangenomen.

De talrijke clinische toepassingen zijn diabetes, magerzucht en dan gecombineerd aan glucose bij perenchymafwijking van de lever. De gebruikelijke handelspreparaten zijn ampullen van 20,40 of [illegible] I.E. per cm^3 ofwel 100 à 400 I.E./5 cm^3. De toediening moet geleidelijk geschieden in een dosis die van de [illegible] bloedsuikerspiegel afhangt en die ongeveer I insuline eenheid per 2 g. afgescheiden koolhydraat in de urine van 24 u. bedraagt.
Het bezwaar is dat de insuline slechts een substitutietherapie kan verzekeren en onophoudelijk gebruikt moet worden. Om overdoseering te vermijden maar tevens een langdurige werking te verwezenlijken geeft men de voorkeur aan inspuiting van depôt-insuline, een weinig oplosbare en resorbeerbare verbinding met protamine en die langzamerhand verbruikt wordt. Die protamine wordt uit de sperma van de zalm getrokken; ze heeft een isoëlectrisch punt van 11,0 ongeveer en fungeert als basische (negatieve) component in het coacervaat met insuline.
Door toevoeging van een buffer (dinatriumphosphaat) aan de oplossing brengt men de pH in de nabijheid van 7,2.
Bovendien voegt men soms nog kleine hoeveelheden Zink aan toe, die ook insulinebesparend werkt.

Het is bekend, dat plantendeelen bloedsuikerverlagende stoffen bevatten (nl. gerst, haver, gistcellen, rogge, selderij, kool[illegible] cannabis sativa). Men noemt die stoffen glykokinine.

De Bijnierhormonen :

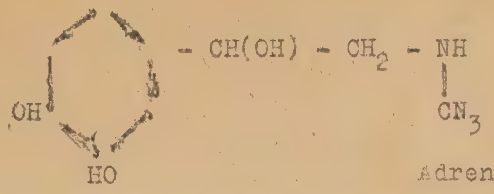
De bijnieren (glandulae suprarenales) zijn kleine hartvormige klieren die liggen aan de bovenste polen der nieren, buiten hun omhulsels. Ze zijn door een vezelachtig vlies omringd en bestaan uit twee anatomisch en functionneel verschillende gedeelten, de schors en het merg. De schors is een vezelachtig epitheliumweefsel en heeft een gestreept radiair uitzicht. Men onderscheidt er drie reeksen cellen. In de middenstreek treft men er de meest karakteristieke celvormen : de spongiocyten en de siderophiele cellen waarvan de korreltjes donker gekleurd worden met ferrichloride. De binnenstreek is roze gekleurd door de talrijke bloedvaten. Het merg bestaat uit cellengroepen die door een netwerk van reticulinevezels en door talrijke elastische vezels ondersteund worden. De cellen zijn week en verschrompelen gemakkelijk bij het fixeeren. Zij hebben een groote kern en het protoplasme is gekorreld. Deze korrels vertoonen een groote affiniteit voor basische kleurstoffen; men noemt die cellen chromaffiene cellen omdat de korrels in verschen toestand groen worden met ijzerzouten en bruin met chroomzouten (aanwezigheid van adrenaline). Vrij talrijke groote sympathische cellen en zenuwvertakkingen komen bovendien in het merg voor.

Het merg en de schors hebben een gansch afzonderlijke hormonale functie.

Bijniermerg en adrenaline :

In het chromaffiene weefsel scheidt zich de adrenaline af, het eerste hormoon, waarvan men de chemische constitutie heeft gekend en die synthetisch bereid werd. Buiten de bijnieren is er ook adrenaline in de paraganglionen en de sympathische weikl[illegible]ren. Het bijniermerg is daarom voor het leven niet onontbeerlijk. De adrenaline wordt bereid door extractie van het fijn gemalen weefsel met heete verdunde azijnzuur. Het bijna eiwitloos filtraat wordt ingedampt met alcohol behandeld en weer geconcentreerd. In zuurstofvrije atmosfeer wordt de oplossing nu met ammoniak alcalisch gemaakt waardoor de base uitkristalliseert. Uit 128 kg. bijnier bereidden op die manier Takamine en Aldrich 125 g. kristallijne adrenaline.

Het natuurlijk product is linksdraaiend, en physiologisch veel werkzamer dan het racemisch stelsel dat door synthese verkregen wordt.



Adrenaline

De voornaamste physiologische functie van de adrenaline is de opwekking van den sympathicus met de hierbij aansluitende verschijnselen (vaatvernauwing, verwijding der longtepels, versnelling van den hartslag, bloedsuikerverhooging als antagonist van insuline, bloeddrukverhooging, remming van maag- en darmbewegingen, pupilleverwijding).

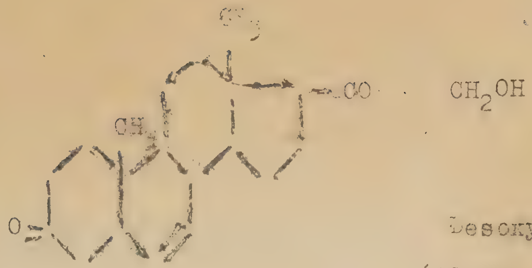
Adrenaline kan door talrijke pharmacologische methoden bepaald worden, die een min of meer groote gevoeligheid hebben. De chemische methoden zijn veel minder specifiek. Het zijn meestal colorimetrische methoden die vooral gebruik maken van de oxydatie tot een roodgekleurde chinonderivaat.
Andere toegepaste kleurreacties zijn die met ammoniummolybdaat, phosphorwolframzuur, diazobenzolsulfonzuur en ninhydrine.

De belangrijkste clinische toepassingen zijn de acute hartinsufficiëntie, ter ondersteuning van de periphere bloedsomloop verder bij longasthma. Ze wordt gebruikt als proef op de werkzaamheid van de eilandfunctie door het nagaan van de graad en den duur van de hyperglycaemie en der daarop volgende hypoglycaemie. Om reden van de snel voorbijgaande werking geeft men soms de voorkeur aan verbindingen van grootere bestandigheid en langer aandurende werking : sympatol en ephedrine.

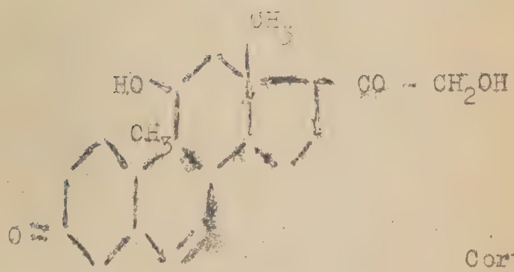
De Bijnierschors en de Desoxycorticosteron :

Sedert geruimen tijd weet men dat de bijnierschors voor het leven onontbeerlijk is. Sedert men de techniek voor de verwijdering der bijnieren (bij kat en rat) beheerscht zijn de uitvalsverschijnselen nu duidelijk bekend, en pas sinds een twaalftal jaren beschikt men over werkzame extracten die de symptomen van de ziekte van Addison vermogen op te hebben. De Addison ziekte is meestal een tuberculeuze aantasting of tumor aan de bijnieren met als symptomen : groote spierzwakte, geestelijke apathie, eetlustgebrek, bruine huidpigmentatie, zeer lage bloeddruk, indikking van de bloed met hierin een sterke daling van het natrium- en chloorgehalte. Er is een grootere natriumchloride uitscheiding aan de nieren en verhoogde gevoeligheid voor kaliumionen. Inspuiting van 20 mg. KCl/Kg. hond is bijv. doodelijk. Een belangrijke stoornis is de koolhydraatstofwisseling : de proefdieren kunnen geen vet resorbeeren noch transporteeren. Het phosphoryleeringsproces in den darm dat de resorptie voorafgaat is bijna volledig geremd. Er is ook een belangrijke indikking van het bloed, het water verlaat de bloedbaan en komt in de extracellulaire ruimte van het weefsel. Dezelfde weg, en in nog meerdere mate, neemt ook het natrium van het bloed. Dit vooral is de doodoorzaak.

De hormonen der bijnieren zijn steriden die, door Kendall in Rochester en Reichstein in Bazel geïsoleerd werden. Van deze zijn er twee bijzonder werkzaam : corticosteron en vooral desoxycorticosteron (die ook synthetisch bereid werd).



Desoxycorticosteron
(21 oxy. - progesteron)



Corticosteron

In plaats van de zuivere hormonen gebruikt men nog bij voorkeur de werkzame extracten. Ze worden verkregen door uitvoerige extractiemethoden. De bevroren klieren worden herhaalde malen met alcohol uitgetrokken, de alcoholische oplossingen worden op permutiet gefiltreerd die de adrenaline adsorbeert zonder verlies aan cortine. Deze extracten zijn echter weinig stabiel, in tegenstelling met de zuivere hormonen.

Desoxycorticosteron is een steride en als zoodanig onoplosbaar in water, wel in olie en organische oplosmiddelen. De kleurlooze kristallen smelten aan 141° en zijn rechtsdraaiend. In den handel komt het voor als acetaat (smpt 157° - 159°).

Biologische ijking :

a) De levensverlengingstest op honden, kat, rat en muis. Na wegnemen van de schors, wordt het preparaat parenteraal toegediend. Men zoekt de minimale dosis om de dieren in gezonde toestand te houden, met een welbepaalde dieet van bekend natrium- en kaliumgehalte.
Het bedraagt gemiddeld 0,5 mg. per dag, per kg. kat.

b) De spiervermoeinistest.
Van een bijnierloos, genarcotiseerd dier (rat) wordt de achterbeenspier electrisch geprikkeld. Het spiercontractiediagram wordt op een kymographion geregistreerd.
Er zijn talrijke eenheden in gebruik :
1 (H.E.) hond-eenheid is de geringste dagelijksche dosis per Kg. dier die een bijnierlooze hond in goede conditie behoudt.
1 (R.E.) rat-eenheid is de geringste hoeveelheid die dagelijks over twee dosissen verdeeld moet worden toegediend om 50% der proefdieren (ratten van vier weken oud) minstens drie weken lang in leven te houden.

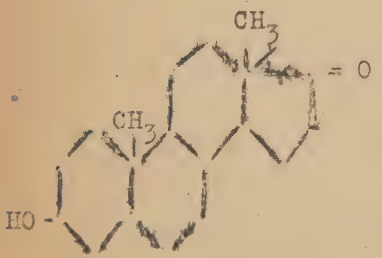
In de vermoeinistest van Fremery-Everse is de R.E. de minimale werkzame dosis per rat (150 g.) die bij drie van de vijf dieren na verloop van vier dagen de vermoeienisverschijnselen opheft. Deze R.E. stemt overeen met ongeveer 50 à 100 H.E.

Desoxycorticosteron of cortine zijn onontbeerlijk bij de behandeling van de Addisonziekte; men tracht tevens door een aan kaliumarme en aan natriumrijke kost het hormoonverbruik te verlagen.
Het is nuttig terzelfdertijd ascorbinezuur te geven die de hormoonwerking versterkt en de huidpigmentatie vermindert. Het schorshormoon is aangewezen eveneens bij hypofunctie der bijnieren, zich uitend onder den vorm van hypotonie, laag bloedsuikergehalte, snelle vermoeienis.

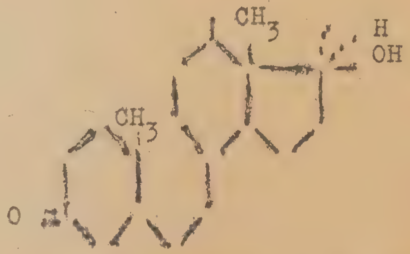
De Mannelijke geslachtshormonen (Testosteron).

Na langdurige voorbereidende proefnemingen (Voronoff, Steinach, Pézard), kon na het uitwerken van de kapoenkamtest (Moore, Gallagher en Koch) het onderzoek over de mannelijke geslachtshormonen quantitatief worden doorgevoerd. Na castratie van jonge hanen atrophieert de kam zich nogal zeer snel. Deze groeit echter terug wanneer men mannelijke sexueele hormonen toedient. De kamgrootte wordt vóór en na de hormoontoevoer door planimetreeren van de schaduw op photographisch papier bepaald. Het hormoon wordt dagelijks ingespoten. De kameenheid is de kleinste hoeveelheid die, dagelijks ingespoten na vijf dagen een groeiwerking van 15% verwekt. Hetzelfde resultaat wordt bereikt wanneer men het preparaat op den kam laat toedruppelen of wanneer men het [illegible] beschildert (snelle resorptie). Het onderzoek heeft dan snel geleid tot het isoleeren van de zuivere hormonen.

Reeds in 1931 werden in het laboratorium van Laqueur te Amsterdam uit testisextracten zeer werkzame producten geïsoleerd. Butenandt en Tcherning isoleerden uit 25.000 l. mannenurine 25 mg eener zuiver kristallijne stof (androsteron) met smeltpunt 182° waarvan 1 γ een kapoeneenheid bedroeg. Later werd de internationale eenheid op 100 γ gesteld.



Androsteron



Cis Testosteron (of n.testosteron)

Nadien heeft Butenandt uit mannen-urine een tweede stof geïsoleerd, die ... is minder werkzaam is : transdehydroandrosteron (met een dubbele binding).

Bij het beproeven van testisextracten, niet alleenmet de hanekammethode maar ook volgens een tweede methode : de teruggroei der teeltballen na castratie en toediening van hormoon, bleken zuiver androsteron en dehydroandrosteron betrekkelijk minder werkzaam dan het overeenkomstig extract. De klierwerking van het levend extract verminderde ook sneller dan de hanekamwerking. Na nog vastgesteld te hebben dat voor zuiver androsteron 1 I.E. niet met enkele mg maar slechts met 100 à 150 γ overeenkomt, nam Laquer het vroeger onderzoek weer op en isoleerde uit 100 kg. stiertestis 10 mg. van een andere hormoon (Testosteron), met 1 kapoeneenheid in 10 à 30 γ stof. Ook hiervan werd de constitutie bewezen.
Dit zou het eigenlijk mannelijk hormoon zijn, daar androsteron en dehydroandrosteron slechts in de urine werden aangetroffen.
De constitutiespecificiteit is slechts gering. Door reductie, oxydatie en methyleering heeft men talrijke biologisch actieve verbindingen bereidt, waarvan enkele nog werkzamer zijn dan de natuurlijke stoffen. Tusschen deze steriden dienen vermeld : androstendion, androstandion, androstandiol, androstanon.

Androstendiol vereenigt terzelfdertijd de mannelijke en vrouwelijke hormoonwerking. De meest werkzame androgene stoffen zijn de monoësters van testosteron en de werkzaamheid neemt af met toenemende ketenlengte der estergroep bij de hanekamtest, wijl ze met de rattentest eerst toeneemt en dan weer vermindert. De meest werkzame ester is het propionaat.

Physiologische werking :

Testosteron is noodig voor de ontwikkeling van de primaire en secundaire geslachtskenmerken en de normale functie van het genitaal apparaat. De talrijke en typische uitvalsverschijnselen worden volledig opgeheven door toevoer van synthetische testosteron. Bij volledige castratie kan bijv. door intramusculaire inspuiting van 40 à 50 mg, testosteronpropionaat per week, normale

potentie terug verkregen worden. Een nog onbekende factor die in de urine, teeltballen, ovarium, tarwe voorkomt en noch androgene noch oestrogene eigenschappen heeft blijkt de werkzaamheid van testosteron nog 4 à 5 maal te verhoogen. De werkzaamheid wordt ook verhoogd door verestering met vetzuren; zoo is testosteron-propionaat tienmaal meer werkzaam dan het vrij testosteron.

De regulatie en de bevordering der hormoonafscheiding geschiedt vooral door de hypophysisvoorkwab. Na wegname van deze klier bij vogels, visschen en zoogdieren valt de secretie der teelballen weg. Omgekeerd stelt men na castratie stoornissen aan de hypophysisfuncties waar, en de schildklierfuncties vallen stil.

Hetzelfde wordt waargenomen bij ontoereikende toevoer van tocopherol met het voedsel. Dat de werking van testosteron en vit.E. in verband staan bewijst het feit dat een terug in werking brengen van de schildklier slechts mogelijk is, wanneer de geslachtsklieren nog onbeschadigd zijn.

Biologische bepalingsmethoden

De werkzaamheid kan onderzocht worden zoowel aan gecastreerde als aan infantiele dieren.

1. Hanekamtest :

Ze is zeer specifiek. Leghornkapoenen van ongeveer 1 1/2 kg. en twee maanden oud worden gecastreerd. Een androgene stof verwekt den teruggroei van den kam en de omvang door den kam bereikt is een functie van de hoeveelheid ingespoten hormoon. Door meting van de kamvlakte zijn nauwkeurige quantitatieve bepalingen mogelijk. De in olie opgeloste stof wordt in de spier ingespoten; bij rechtstreeks aanbrengen op den kam kunnen echter nog veel geringere hormoonhoeveelheden worden aangetoond. Men vergelijkt aan het standaardpreparaat.

2. Vesiculaire klierentest :

Geslachtshormonen bewerken den groei en de vermeerdering van mannelijk epithelium en herstel van de secretiemogelijkheid. Het gewicht der vesiculaire klieren bij gecastreerde ratten bedraagt 15 mg. gemiddeld.

Na tien dagen dagelijksche inspuiting van 50 γ testosteron bedraagt ze 42 mg, van 100 γ : 62 mg, van 200 γ 124 mg. Na tien dagen met dagelijks 50 γ testosteron propionaat : 225 mg.

Eenheden :

1 Intern. kam-eenheid (K.E.) is de hoeveelheid van een preparaat die in de hanekamgroeitest dezelfde werking heeft als 0,1 mg. zuivere kristallijne androsteron. Door vijfdaagsche spierinspuitingen is er vlaktetoename van 15 %.

1 rat-eenheid (R.E.) is de kleinste hoeveelheid hormoon die de klieren van het genitaal apparaat bij 50 % der gecastreerde ratten gedurende twintig dagen in normale conditie behoudt.

1 R.E. is ongeveer gelijk aan 6 K.E.

1 K.E. stemt overeen met 25 - 30 γ trans (x) Testosteron (epi)
" " " " 4550 γ Androstendiol.
" " " " 150 - 200 γ epiAndrosteron (CH_3 en OH in ander vlak : trans)
" " " " 200 γ Androsten -dion
" " " " 1400 γ n.Androsteron (CH_3 en OH in dezelfde vlak : cis)

(x) zie nomenclatuur der steriden

De vrouwelijke geslachtshormonen (oestradiol en progesteron)

In het schorsgedeelte van de eierstokken bevinden zich de de Graaf-follikels, waarin zich de eicellen vormen. Deze follikels kunnen in volume toenemen, uitzetten, rijpworden; voor sommige dezer follikels is de rijping onvolledig en worden ze weer geresorbeerd (atretisch verloop).

Bij geslachtsrijpheid komen de meeste eieren tot volledige rijpheid, de follikel verkrijgt dan een diameter van ongeveer 1 cm., en het ei samen met het follikelsap komt in de tubus, waar het gebeurlijk bevrucht kan worden. Het follikelbarsten gebeurt gewoonlijk tusschen den 11e en 21ste dag, na de laatste menstruatie. De in de eierstok achternagebleven follikel wordt na enkele dagen omgezet tot gele stof (corpus luteum). Is er geen bevruchtiging dan wordt het ei binnen korten tijd geresorbeerd, de gele stof wordt omgezet tot corpus luteum menstruationis, en hierop volgt dan de menstruatie.

Na deze eerste menstruatie herbegint weer de volledige cyclus. Hierbij zijn hoofdzakelijk twee hormonen werkzaam : het follikelhormoon en het in het corpus luteum gevormd progesteron. Het eerste verzekert de physiologische en histologische veranderingen die tot rijpheid van het ei voeren, het corpus luteumhormoon zorgt voor de slijmvliesveranderingen en celomzettingen noodig voor de inbedding van het bevruchte ei, afsluiting van de andere follikels, die dan geen andere eieren meer kunnen afstooten, en bevestiging van de factus.

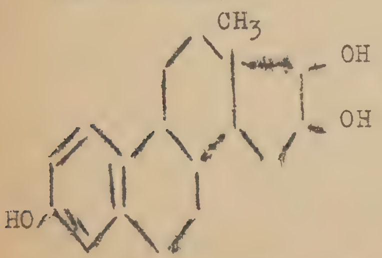
Gedurende de cyclus gebeuren kenmerkende veranderingen in het slijmvlies van de scheede, die bijv. bij knaagdieren, als test kunnen gebruikt worden. De follikelhormonen heeft men kunnen isoleeren dank aan den leiddraad van een nauwkeurige onderzoekings-en bepalingsmethode. Het is de Allen-Doisytest toegepast op ratten en muizen. Bij deze knaagdieren is de sexueele cyclus beperkt tot 4 à 10 dagen, de bronst duurt slechts een dag. De veranderingen bij follikelrijping en follikelbarsting en de vorming van het corpus luteum zijn ook anders dan bij den mensch. Bij de knaagdieren beperken de veranderingen zich niet tot de uterus, maar

er zijn ook veranderingen in de slijmhuid der eileiders, en vooral van de scheede. De omzetting van het scheedeslijmvlies gedurende de bronstperiode kan worden gevolgd aan karakteristieke veranderingen van het vaginaal sekreet. Men heeft opeenvolgend :

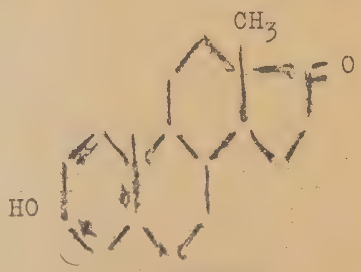
1. Ruststadium (diöstrus) afstijksel bevat : slijm, epitheelcellen, leucocyten.
2. Proliferatiestadium (proöstus) " " : geen slijm, epitheelcellen (met kern, en leucocyten verdwijnen);
3. Bronst (östrus) afstijksel bevat : Verhoornde epitheelcellen = kernlooze schollen.
4. Metöstr. afstijksel bevat : leucocyten, epitheelcellen, enkele schollen die verdwijnen.

Het optreden van het schollenstadium karakteriseert dus de bronst; een afstrijksel bevat dan slechts kernlooze schollen (kleurbaar met hemaluin-eosine, hematoxyline). Bij gecastreerde dier blijft het slijmvlies met rust en na toediening van eierstokextract of follikelhormoon treden de cyclische veranderingen weer op.

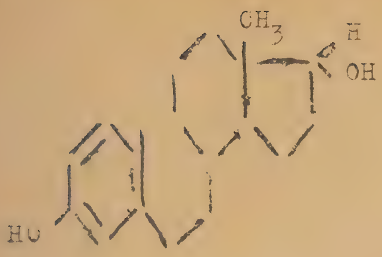
Uit de urine van zwangere vrouwen werd in 1929 bijna gelijktijdig door Doisy in de V.S., Butenandt in Göttingen, Laqueur in Amsterdam een kristallijnfollikelhormoon geïsoleerd, later werd die stof oëstron genoemd. Tegenwoordig heeft men uit biologisch materiaal vijf follikelhormonen kunnen isoleeren en hun constitutie ophelderen : oestron, oëstriol, oëstradiol equiline en equilenine. Synoniemen zijn oëstron : follikelhormoon, theeline, menformon; voor oëstriol : follikelhormoonhydraat of theelol en voor oëstradiol : dihydrofollikelhormoon (2 waterstofatomen meer den Oëstron).



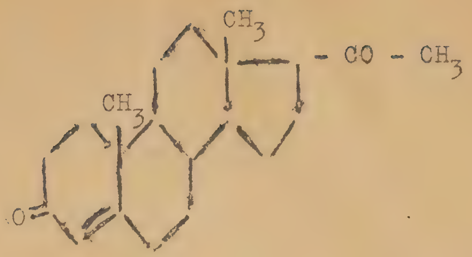
OESTRIOL



OESTRON



OESTRADIOL

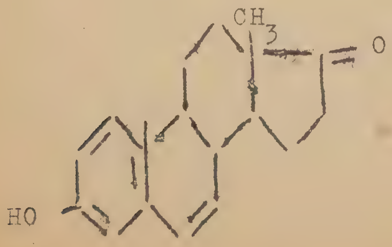


PROGESTERON.

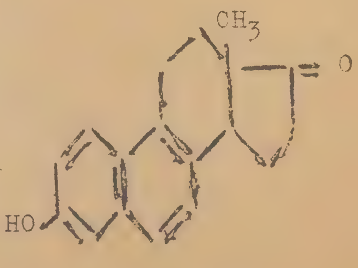
Er is dus een gansche groep verbindingen die bij het gecastreerd dier bronst kunnen verwekken. Het zijn steriden, die onoplosbaar zijn in water, wel oplosbaar in olie en organische oplosmiddelen. Ze zijn optisch werkzaam, goed kristaliseerbaar met een scherp sm[illegible] punt, en zeer bestendig tegen verwarming, zuurstof der lucht en z[illegible]. Ze kunnen synthetisch bereid worden uit cholesterol. Bij de bereid[illegible] van oëstradiol door catalytische hydreering ontstaan twee isomeren verbindingen, het α en β oestradiol, die door breukkrisstallisatie of door neerslaan met digitonine kunnen gescheiden worden.

β oestradiol is [illegible] 20 maal meer werkzaam dan de α vorm en de vetzuuresters zijn ook werkzamer dan het eigenlijke hormoon. In de therapie gebruikt men vooral het oëstradiolbenzoaat dat in water oplosbaar is.

De uitscheiding van het follikelhormoon geschiedt bij den mensch en het paard in de urine onder vorm van oëstron- en oëstriolesters. Drachtige merriën scheiden in de urine daarbij nog oëstra[illegible], equi-line en e[illegible] beide laatste ook met bronstverwekkende eigenschappen.



EQUILINE



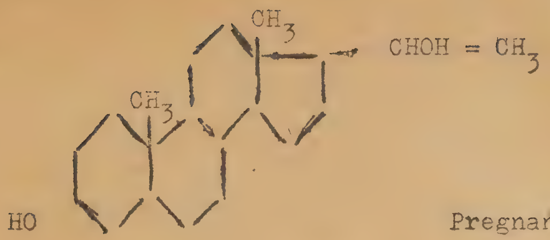
EQUILENINE

Oëstron en oëstriol, die in vergelijking met oëstradiol, biologisch minder werkzaam zijn, komen in de urine gebonden voor, de eerste aan zwavelzuur, en oestriol aan glucuronzuur. Deze verbindingen zijn nog minder werkzaam dan de vrije hormonen. Bij quantitatieve bepalingen hoeven ze eerst door behandeling met zuur of alcali in vrijheid gesteld, en dan met aether geëxtraheerd te worden. Ook in het bloed en de organen zijn de vrouwelijke geslachtshormonen gedeeltelijk onder gebonden toestand. Zoo komen de oestrogene stoffen in het bloed van zwangere vrouwen tot 30 %, in het bloed van drachtige merriën tot 80 %, onder een gebonden, in aether onoplosbare vorm voor.

Het bereiden van extracten voor chemische of clinische doeleinden is hierop gesteund dat folliculine oplosbaar is in lipo de oplosmiddelen, en door neerslag met aceton of andere manipulatie van de bijgeleidende sterolen kan gescheiden worden. De vochtige organen extraheert men met alcohol of aceton; het in het vacuum gedroogd poeder daarentegen behandelt men met benzol, chloroform of aether. Ook uit plantenmateriaal, nl. rhabarber, kool, rapen, gist, plantenbloeiën en vruchtknoppen kan men oëstrogene stoffen extraheeren.

Het corpus luteum-hormoon wordt bepaald met de test van Corner-Allen. De vrouwelijke konijnen worden 14 à 18 uren na de paring gecastreerd en een stuk van den uterushoorn wordt uitgenomen om den toestand van het uterusslijmvlies histologisch te controleeren. Het slijmvlies moet nog in de proliferatieperiode zijn. De onbekende stof wordt in olieachtige oplossing binnen de vijf dagen onderhuids ingespoten. Na de zesde dag worden de dieren gedood en het baarmoederslijmvlies wordt histologisch onderzocht. Men bepaalt dan de kleinste hoeveelheid die het prolifereerde slijmvlies omzet tot een pseudo graviede slijmvlies.

Het hormoon, progesteron werd in 1935 zuiver verkregen; het komt onder twee kristalmodificaties voor (α progesteron smpunt : 128°, β smpt. : 121°), van nagenoeg dezelfde werkzaamheid, die gevoelig zijn voor alcali in onzuivere extracten, maar wel bestendig als zuiver kristallijne stof. In de urine wordt het als pregnand (gehydreerde vorm), en vooral aan glucuronzuur gebonden, afgesch



Pregnandiol.

Onder die vorm is het biologisch zeer weinig werkzaam. De werking van het ovarium staat onder invloed van de gonadotrope hormonen der hypophysisvoorkwab, het follikelrijpingshormoon (Prolaan A) en het leuteïniseeringshormonn (prolaan B). Dit is ook gebleken uit proeven op dieren waarvan men op jonge leeftijd de hypophysis had weggenomen.

De waardebepaling geschieden door de biologische methoden resp. van Allen - Doisy en Corner - Allen.

Eenheden :

1) Follikelhormoon :

I Internationale eenheid is de hoeveelheid oëstrogene stof die in de Allen-Doisy test dezelfde werking uitoefent als 0,1 γ oëstron (internationale standaard). Men vervangt die dikwijls ook door de internationale benzoaat eenheid (I.B.E.) die gelijk is aan de werking van 0,1 γ oëstradiolbenzoaat.

Als rat- of muiseenheid bedoelt men de kleinste hoeveelheid eener stof, die noodig is om bij 50% der proefdieren in de Allen-Doisy test het oëstrusstadium te doen ontstaan. De resultaten zijn echter veranderlijk en leiden tot verwarring (wijze van inspuiten en verdeeling over verschillende dosen).

2) Luteushormoon :

Een internationale eenheid is de hoeveelheid stof die op het uterusslijmvlies van het konijn dezelfde werking heeft als 1 mg progesteron.

Een konijn-eenheid (K.E.) is de kleinste hoeveelheid eener stof die bij volwassene konijnen de omzetting van het uterusslijmvlies in de secretiephase bewerkt 1 K.E. = 0,5 mg. progesteron. Men gebruikt ook soms de klinische eenheid.

1 mg. progesteron : 1 I.E. = 2 K.E. = 4 Klin.eenheden.
Volgende tabel geeft een overzicht van het voorkomen en de werkzaamheid der follikelhormonen.

	Muisgenheden per gram stof	voorkomen
Oëstradiol	25-30 millioen	Varkensovarium, urine van drachtige merriën.
Oëstron	8 millioen	Zwangere urine, urine van dr.merriën, Palmpittenextractierest.
Oëstriol	75.000	Zwangere urine, placenta, wilgenkatjes.
Equiline	1.500.000	Uriné van drachtige merriën.
Equilenine	4 - 700.000	idem.

Clinische toepassingen :

Beide hormonen zijn in de gynaecologie onontbeerlijk geworden. Het follikelhormoon wordt bij menstruatiestoornissen toegepast, amenorrhee, dysmenorrhee, klimakterische stoornissen. Bij lichte insufficiëntieverschijnselen gebruikt men in den regel klierpreparaten, en bij zware gevallen de synthetische zuivere verbindingen. De ingespoten vormen zijn veel werkzamer dan de peroraal toediening.

Per os gebruikt men dragées van 100 à 10.000 I.E. voor inspuiting ampullen met 1 mg. of 5 mg. östradiolbenzoaat.
Het luteushormoon wordt vooral toegepast bij abortus.
Men gebruikt vooral ampullen met 1 à 5 mg. progesteron.

Ovarium siccum :

Ter bereiding van het ovariumpoeder gebruikt men de organen van het rund, schaap of varken.
Bij de koe is het een klein ovaal orgaan van 3-5 cm. lengte en 2 cm. dikte. Na doorsnijden van de oppervlakte kan men hierin met de loupe onderscheiden de krans van follikels, ingebed in het ovariumstroma. Inwendig vindt men de ova in verschillende rijpingstoestanden. Na openbarsting van een follikel is deze gevuld met een oranje gele stof (corpus luteum).

De ingebedde en gekleurde secties laten zien :

1. De schors met een laag bevruchtingscellen en hieronder het bindweefsel of stroma. Het weefsel onder het proliferatieepithelium wordt geheeten : tunica albuginea.
2. Het merg of medulla is een los bindweefsel met talrijke bloedvaten en zenuwvezels. Enkele breede follikels reiken tot hierin over. De grootere follikels hebben een epitheliumlaag.

Een gram officineel poeder vertegenwoordigt zes deelen versche klier, gedroogd in het vacuum bij een temperatuur lager dan 60°. Het mag niet meer dan 7% totale asch bevatten.

De Hypophysis :

De hypophysis is een eivormig lichaam dat ligt aan de basis van den schedel van werveldieren, gelogeerd in de sella tursica van het sphenoïde been. Het is via de hypophysisteel met de daarboven liggende hersenbasis verbonden. Men onderscheidt de voor- en de achterkwab en een middengedeelte (totaal gewicht bij den mensch is ongeveer 0,5 g. met 70% voorkwab, 20% achterkwab en 10% middenkwab). De voor- en middenkwab vormen de adenohypophysis, ze hebben een klierachtig karakter en een epitheliale oorsprong; het is een insprong van de vroegere primitieve mondholte van het embryo. De achterkwab of neurohypophysis is samengesteld uit nerveuze elementen en via het infundibulum is ze met de hersenen vereenigd. De hypophysis is deels een echte klier (voorkwab) en deels stamt zij van het centrale zenuwstelsel af. In haar schijnen het endocriene en het nerveuze systeem elkaar werkelijk te raken. Het endocriene systeem regelt autonoom de levensfuncties en de constantheid van het inwendig milieu, het waarborgt de aanhankelijkheid binnen het organisme. Iedere cel heeft bijv. genetisch een zekere groeiimpuls meegekregen, doch de natuur heeft een centrale instantie geschapen, die het normale verloop regelt. Het centrale zenuwstelsel is bestemd om het organisme te oriënteeren tegenover de buitenwereld. Deze twee systemen staan met elkaar in verbinding in de hypophyse. Bv. veel licht in de winter geeft sterke vergrooting van de testikels door de lichtprikkels via het centraal zenuwstelsel

(het oog) of de hypophysis die via de achterkwab met de hersenen verbonden is, en die het gonadotroop hormoon uitstoot.

Al komen in het kleine orgaan slechts drie verschillende celsoorten voor, toch zijn reeds acht en twintig verschillende hormoonfuncties beschreven. Er kan geen sprake van zijn dat 28 verschillende stoffen zouden gevormd worden en die veelzijdige werking der hypophysis blijft een raadsel van het hoogste belang. De hypophysis zou twee soorten hormonen produceeren : eerst die met zelfstandige functie en dan ook de glandotrope hormonen waarmede de voorkwab in de eerste plaats een regulatorische rol op het gezamenlijk systeem van inwendige secretie uitoefent. De best gekarakteriseerde hormoonfuncties zijn de volgende :

1. Voorkwab :

a) Groeihormoon
b) Prolactine
c) Thyreotroophormoon
d) Gonadotroop hormoon
e) Corticotroop hormoon
f) Adrenalotroop hormoon
g) Parathyreotroop hormoon
h) Pancreotroop hormoon
i) Koolhydraatstofwisseling hormoon (diabetogeen).
j) Vetstofwisseling hormoon
k) Eiwitstofwisseling hormoon.

2. Middenkwab :

l) Melanophoren hormoon

3. Achterkwab :

m) oxytocine
n) Vasopressine
o) Adinretine

Het belang van de hypophysisklier blijkt uit de diepgaande stoornissen die na wegname optreden, in den groei, de functie der geslachtsklieren, de stofwisseling, vergezeld van atrophie der bij-

nierschors. Nochtans is de extirpatie bij den hond niet rechtstreeks levensgevaarlijk. De stofwisselingwerking van de hypophysis voorkwab is waarschijnlijk van onrechtstreekschen aard.
Slechts de eerste vier hormoonwerkingen van de voorkwab zijn van beteekenis voor medische toepassingen.

Het groeihormoon :

Het behoort tot de proteohormonen en bezit de typische eigenschappen van een eiwit (wordt uit waterige oplossingen uitgezouten, is niet dialyseerbaar of ultrafiltreerbaar, onoplosbaar in organische oplosmiddelen en wordt door verwarming vernietigd) Het kan uit versche organen of het met aceton gedroogd poeder (zie verder bij achterkwab) met waterige alkalische oplossingen, of met zure aceton, of 60 procentige alcohol geëxtraheerd worden. Door neerslaan en adsorptie aan kool kan men preparaten bereiden die vrij zijn van prolactine, gonadotrope en thyreotrope werkstoffen en slechts sporen van corticotrope hormonen bevatten. De waterige oplossingen zijn zeer weinig stabiel en toevoeging van de gebruikelijke conserveeringsmiddelen maakt het preparaat onwerkzaam, natriumbenzoaat en butanol kunnen hier slechts gebruikt worden. Aan zeer lage temperatuur of onder vorm van droog poeder kan echter het groeihormoon langen tijd zonder verlies van werkzaamheid bewaard blijven.

Evans en Long behandelden ratten met physiologische oplossingen van voorkwabextracten en na een jaar hadden de dieren ongeveer een dubbel gewicht van de contrôledieren bereikt.
Onder de beste voedingsvoorwaarden treedt groeistilstand bij klierlooze jonge dieren op.

De bepaling van het groeihormoon is lastig en langdurig (8 maanden) met normale dieren; bij hypophysislooze dieren duurt ze slechts 3 à 4 weken. Een rateenheid groeihormoon is die hoeveelheid welke aan hypophysislooze rattewijfjes dagelijks (over twee inspuitingen verdeeld) moet worden toegediend, om binnen de 15 dagen een gewichtstoename van 15 gram te verwekken.

Het lactatiehormoon : Prolactine :

Het is waarschijnlijk een proteohormoon met analoge eigenschappen. De rijkste bronnen zijn rund- en schaaphypophysisen. Het is met alcalisch water, alcalische alcohol aan 70%, of zure aceton extraheerbaar. Door neerslaan bij het isoëlectrisch punt wordt het van de andere hormonen, intermedine en achterkwabhormonen die in oplossing blijven, gescheiden. Medeneergeslagen groeihormoon wordt door toevoeging van cresol vernietigd. Prolactine is betrekkelijk goed bestendig en de oplossingen kunnen aan pH = 7,4 door tweemaal verwarmen aan 100° gedurende 20 minuten zonder verlies aan werkzaamheid gesteriliseerd worden. Zouten daarentegen verminderen de werkzaamheid. Onlangs zou prolactine kristallijn zuiver verkregen zijn geweest.

Dit hormoon wekt de melksecretie op, en houdt die in stand in de door de geslachtshormonen voorbereide klieren.
De quantitatieve bepaling geschiedt met de kroptest bij duiven. De werkzaamheid der stof wordt beoordeeld aan het gewicht der kropklier, en het te onderzoeken preparaat wordt op vier opeenvolgende dagen in de spieren ingespoten.

Een internationale eenheid is gelijk aan 0,1 mg. standaard preparaat. 1 Duif-eenheid (D.E.) is de kleinste hoeveelheid die dagelijks eenmaal ingespoten gedurende 4 dagen, 96 uur na de eerste inspuiting een begin van verdikking van den krop verwekt.
1 D.E. is ongeveer gelijk aan 10 I.E.
De klinische toepassingen zijn echter nog zeer beperkt.

De gonadotrope hormonen : Prolaan A en Prolaan B

Het zijn de physiologisch best gekende hypophysis factoren. Voorkwabextracten met die hormonen verwekken bij infantiele dieren rijpwording der follikels, bloeding in de gezwollen follikel, vorming van corpus luteum en bronst. Het zijn ook proteohormonen, maar zuiver werden ze nog niet verkregen. De typische eiwitreacties zijn positief maar het moleculair gewicht zou schommelen tusschen 800 en 12.000.

Dit voor een eiwit betrekkelijk laag moleculair gewicht zou de dialyseerbaarheid door perkamentwanden verklaren. Prolaan A en B zijn oplosbaar in zwak zuur - en zwak alcalisch water, evenals in 60% alcohol of aceton. In zwak zuur milieu zijn ze aan kieselgur, kleiaarde, ijzerhydroxyde, adsorbeerbaar. In waterige oplossing zijn die werkstoffen echter weinig stabiel en door koken worden ze volledig onwerkzaam gemaakt. In droge toestand daarentegen kunnen ze zelfs tot aan 100° verwarmd worden.

Pepsine tast het molecule niet aan, maar wel trypsine. Zooals alle proteohormonen behouden ze hun volle werkzaamheid slechts bij parenterale toediening. De zuiverste preparaten die men tot nu toe verkregen heeft bevatten 100 ratteneenheden of 1200 à 3.000 muiseenheden per mg.

De gonadotrope hormonen der voorkwab reguleeren de normale werking der geslachtsorganen. Prolaan A is het follikelrijpingshormoon en Prolaan B het luteiniseeringshormoon. Bij mannelijke individuën beïnvloedt het eerste het generatieve weefsel en het tweede het interstitieele weefsel der [illegible]klieren. Bij gebrek aan geslachtsklieren hebben de hypophysis extracten geen werkzaamheid, en omgekeerd bij gebrek aan voorkwab komt de geslachtelijke ontwikkeling aan het infantiele stadium tot stilstand. Toediening van gonadotrope hormonen kan bij infantiele dieren een vroegtijdige geslachtsrijptheid verwekken.

De gonadotrope hormonen worden met de urine uitgescheiden. De gezonde vrouw scheidt 10 à 30 M.E. per liter, de man 10 M.E. per liter, af. Bij zwangere toestand begint reeds aan den aanvang de afscheiding aanzienlijk toe te nemen, zoodat de hormonen reeds in enkele cm³ aantoonbaar zijn (vroegtijdige diagnose van zwangerschap).

In de eerste vijf weken worden 30.000 M.E./l. afgescheiden.

na 3 - 5 maanden worden 5 - 16.000 M.E./l. afgescheiden.

na 7 -10 maanden worden 4 - 12.000 M.E./l. afgescheiden.

Kort voor de geboorte daalt het gehalte op 300. (in pl.v. 10 à 30 M.E./l.). Mannen scheiden aan hooge ouderdom, en bij sommige tumoren aan de teelballen ook soms veel grootere hoeveelheden af.

Bepalingsmethoden :

Als proefdieren gebruikt men infantiele muizen van 3 à 4 weken oud, wegende 6 à 8 g. of ratten van 25 à 30 gram. Muizen zijn voor Prolaan B gevoeliger dan ratten, en omgekeerd (ratten gevoeliger voor Prolaan A).

Prolaan A : 1 Rateenheid is de kleinste hoeveelheid van een preparaat, die na inspuiting op drie opeenvolgende dagen het ovariumgewicht van infantiele ratten binnen de 96 uren vijf maal vergroot.

R.E. prolaan A is de dosis die over 3 dagen verdeeld, subcutaan ingespoten, bij 50% der infantiele ratten na 100 uren bronst (schollenstadium) in het ovarium verwekt.

1 muiseenheid (Prolaan A of B) is de kleinste hoeveelheid stof die bij de nog niet geslachtsrijpe muis na 100 uren en verdeeling der totale dosis over zes gelijke dosissen op afstanden van 12 uur ingespoten het optreden van bronst en luteiniseering verwekken. De klinische toepassingen zijn alle vormen van ontoereikende afscheiding van geslachtshormonen.

Bereiding van gonadotrope hormoonpreparaten:

Men kan uitgaan van de hypophysis, maar de opbrengst is dan slechts gering. De opbrengst is veel grooter wanneer men uitgaat van de urine van zwangeren. Men vindt er duizenden M.E. per liter, terwijl een koehypophysis slechts 100 à 200 M.E. bevat.

De bereidingsmethode van Zondek is de volgende : 1 l. zwangere urine wordt met azijnzuur zwak zuur gemaakt op lakmoes, en gefiltreerd. Men voegt 46 l. alcohol aan 96 % aan toe en laat na herhaald schudden 24 uur staan. Het neerslag met de prolaan wordt afgecentrifugeerd, met aether gewasschen en in water opgelost. Na afcentrifugeeren van verontreinigingen kan de oplossing door herhaling van het neerslaan met alcohol verder gezuiverd worden. Het resteerend wit-geel poeder is in water zeer oplosbaar en bevat gemiddeld 1 R.E. per 20 γ.

Men kan verder zuiveren, door neerslaan der oplossing met phosphowolframzuur (of phosphomolybdeenzuur), verwijdering van dit zuur als beriumzout, afscheiding van de overmaat berium met kooldioxyde en verdamping der waterige oplossing in het vacuum. Men bekomt zoo preparaten met gemiddeld 300 R.E./ mg. Verder kan men nog zuiveren door dialyse. Zondek bereikte zoo preparaten waarvan 1 R.E. = 1 γ

Een andere bron ter bereiding der gonadotrope hormonen is het bloed van drachtige merrien. Hierin vond Zondek gemiddeld 4000 M.E. per liter serum. Men werkt volgens de methode van Gustus. Het plasma wordt met water verdund, met verdund zoutzuur bij een pH van 3,5 gebracht, en door centrifugeeren opgehelderd. Men voegt aan toe een suspensie van Aluminiumoxyde (Type A van Willstätter) in water, en roert een half uur. Het adsorbens wordt vervolgens met een zwak alcalische (ammoniak) oplossing geëlueerd en de hormoonoplossing wordt na aanzuren 30 uren aan 12° tegen water gedialiseerd (cellophaanwand). De oplossing is zoo bevrijd van ammoniumzouten; resten aluminiumoxyde worden afgecentrifugeerd. De oplossing wordt geïsotoniseerd met natriumphosphaat en gesteriliseerd door filtratie op een Chamberlandkaars.

De hormonen der achterkwab :

De hormonen der achterkwab, oxytocine, vasopressine, adiuretine, behooren tot de proteohormonen en zijn in water goed oplosbaar. Met toenemende zuiverheidsgraad verhoogt hun oplosbaarheid in alcohol; ze zijn echter onoplosbaar in andere organische oplosmiddelen. Ze zijn zeer gevoelig aan alcali maar weinig gevoelig aan zuur.

In zuur milieu kunnen ze zelfs tot aan 100° verwarmd worden. Ze zijn dialyseerbaar en worden aan de meest verscheidene stoffen gemakkelijk geadsorbeerd. Hun moleculair gewicht wordt gemiddeld op 600 geschat. Ze worden door trypsine en erepsine verteerd, maar niet door pepsine noch papaïne. Men heeft de drie hormonen kunnen scheiden op grond van verschillen in adsorbeerbaarheid, bestendigheid tegen verwarming en gevoeligheid voor neerslaande organische oplosmiddelen.

Om het oxytocische van het vasopressorisch bestanddeel te scheiden behandelt men de droogrest van het achterkwabextract met ijsazijn of propionzuur, en uit deze oplossing worden de bestanddeelen gefractionneerd door neerslaan met aether of petroleum aether. Men kan ook scheiden door adsorptie aan bentoniet of silicagel waar de vasopressine sterker aan geadsorbeerd is dan oxytocine.

Het hypophysisachterkwabextract is een belangrijk hulpmiddel om de baarmoedercontractie tijdens de verlossing te steunen. De klier, meestal van het rund, moet uit het lichaam zoo gauw mogelijk na de slachting verwijderd worden en rechtstreeks aan de extractiebewerkingen onderworpen worden. 1 cmc. van het steriel tract moet overeenstemmen met 1 mg standaardpoeder (tot 80 à 120 met de test op de uteruscontractie van de cavia).

Ter bereiding van het standaardpoeder (zie B.PH) kiest men 25 of meer posteriorkwabben van veedieren, uit het dier verwijderd binnen de 30 min. na de slachting en bevrijd van vreemde weefsels.

Men brengt ze in aceton waarvan de hoeveelheid ongeveer meer is dan 4 cc. per klier, en laat 3 uur in aanraking. Het materiaal wordt fijngesneden met een schaar en opnieuw in versche aceton gebracht (zooveel als bij de eerste behandeling). Men laat in aceton overnacht staan, verwijdert de massa hieruit en droogt in een vacuumexsicator op calciumchloride bij de temperatuur onder 50° gedurende 5 uur. De massa wordt daarna fijn gepulverd en door een zeef nr. 0,40 (nr. 0,15) gewerkt. Dit fijne poeder wordt nog eens twaalf uur beneden 50° op Calciumchloride in het vacuum gedroogd. Hierop volgt nog een extractie in een Soxhlet apparaat met aceton gedurende 3 uur. Eindelijk droogt men nog eens 12 uur op calciumchloride.

Bereiding van het extract :

Het standaardpoeder afwegen, in een kleine agatamortici brengen en bevochtigen met enkele druppels gedestilleerd water bevattende 0,25 % azijnzuur. Men wrijft zeer fijn tot een onvoelbare massa, voegt nog enkele cm³ verdunde azijnzuuroplossing aan toe [illegible] Alles wordt omgespoeld met verdun

zuur en hiermede wordt aangevuld tot een eindvolume, in cm3 gelijk aan het aantal mg. gedroogd poeder. Men verwarmt tot koken gedurende een minuut en filtreert. Aan de gekozen zuurgraad (pH ± 3 à 4) in het hormoon bestendig tegen een verwarming van korten duur tot aan het kookpunt, die juist voldoende is om vreemde eiwitten te coaguleeren.

De oplossing wordt in ampulla gebracht en gesteriliseerd gedurende 20 minuten op drie achtereenvolgende dagen bij een temperatuur van 60 à 80°; De ampulla moeten in een frissche plaats bewaard blijven (5 à 15°); ze zijn niet langer dan zes maand houdbaar.

IJking :

Infantiele caviae, wegende 175 à 350 g., zonder dracht, worden gedood. De uterus wordt weggenomen, en de uterushoorn wordt gesuspendeerd in een Locke-Ringeroplossing in verbinding met een hefboompje en een registreerapparaat (kymographion). De temperatuur van het bad (37 à 38°), mag niet meer dan 1/10e varieeren gedurende de proef, die slechts mag aanvangen na volledige losse toestand van het weefsel (15 à 30 minuten).

Afwisselend brengt men in de oplossing wisselende hoeveelheden standaardextract en testoplossing, tot in beide gevallen dezelfde contracties verkregen worden (2 paar proeven).

De Leverpreparaten :

Minot en Murphy vonden in 1925 dat pernicieuze anaemie kan worden genezen door een dieet dat 200 gr. versche lever bevat. Hierin zou dus een stof voorkomen die het haemoglobinegehalte van het bloed en het aantal roode bloedcellen tot hun normale waarde terugbrengt.

Castle vond dan later dat met normaal maagsap verteerd spiervleesch een gelijke werkzaamheid heeft. Het normaal maagsap zou een onbekend enzyme (inwendige factor) bevatten dat uit bepaalde voedingsstoffen (uitwendige factor) het antiperniciosa princiep zou doen ontstaan. Het proces voltrekt zich in de maag zelve, ter bewijze dat de pernicieuze anaemie door toediening van maagpoeder

even goed als door de levertherapie te behandelen is. Over den aard van den uitwendigen factor (haemogeen) bestaat op dit oogenblik nog geen zekerheid, deze zou in de gist, graanzemelen, lever, spieren, nieren, hersenen en eieren voorkomen. Vanzelfsprekend zal die factor dan ook maar genezend kunnen werken wanneer het maagslijmvlies normaal werkt, en er geen achylie is. De inwendige factor (haemogenase of haemopoiëtine geheeten) is zeer thermolabiel, zoo dat vijf minuten verwarmen aan 100° de werkzaamheid vernietigd. Over de chemischen aard van de antiperniciosa stof (soms ook haemopoiëtine of anahaemine geheeten) is nog niets bekend en de goede werkzaamheid van de orgaanpreparaten kan voorloopig allen maar door klinische proeven bewezen worden. In plaats van een walgelijke groote hoeveelheid lever verkiestmen immers het toedienen van wel of niet injiceerbare extracten, die echter met nauwkeurige zorgen moeten bereid worden.

Ter bereiding van het leverpoeder wordt kalfs- of rundslever eerst fijngehakt of gemalen en daarna in bokalen met een overmaat aceton overdekt. Na 24 uur wordt deze aceton afgeschonken, de lever op een filterdoek verzameld en vervolgens beneden 40°, in het vacuum gedroogd. De massa wordt daarna tot poeder nr. 0,30 fijn gemalen en weer even gedroogd.

Minot en Murphy bereidden leverextracten op de volgende manier : de ossenlever wordt fijngemalen en tot een brei gekneed. Het mengsel wordt licht alcalisch gemaakt (pH : 9, om autolyse te verhinderen) en gefiltreerd. Het filtraat wordt gebracht bij een pH van 5,0 (neerslag van de leverproteïne) en de gefiltreerde oplossing wordt door verwarming aan 70° van andere eiwitten nog bevrijd. Het filtraat wordt in vacuo bij 60° ingedampt. Ter verdere zuivering wordt de rest met aether, en het hierin onoplosbaar gedeelte met alcohol, geëxtraheerd. De alcohol bevat dan de bloeddrukverlagende stof, het neerslag daarentegen de antiperniciosafactor.

Er zijn talrijke werkwijzen ter bereiding van extracten. Men kan bijv. op de volgende wijze te werk gaan. De bevroren lever wordt gemalen, dan met 1½ volume alcohol 96° 8 à 12 uur lang geroerd, en uitgeperst. De oplossing wordt dan in vacuo en lage tem-

peratuur van de alcohol bevrijd. De waterig
geëxtraheerd ter bevrijding van lipoïden. Na
aether wordt de waterige oplossing gefiltreerd
1/10 in volume van het gewicht versche lever.
Men voegt 0,3 % cresol aan toe en steriliseert d
In tegenstelling met de werkwijze van Minot en Murp
bleken dat door bevordering van de autolyse de antian
werkzaamheid toeneemt. De antiseptische leverbrei wordt
roformwater en zoutzuur, tot een pH van 4,5 - 6,5 gedurend
14 dagen bij een temperatuur van 20° à 30° behandeld. Daarna ver
dampt men in het vacuum en filtreert de rest.

Ter verwijdering van ballaststoffen kunnen de koolhydraten vernietigd worden door gist. Daarna kunnen de proteïnen en de resteerende gist door een verteringsproces met pepsine en zoutzuur, tot aminozuren gehydrolyseerd worden. De pH der oplossing wordt dan weer op zijn oorspronkelijke waarde ingesteld; men slaat de oplossing neer met alcohol en dampt ze in het vacuum in.

Ter bereiding van maagpreparaten kan als volgt te werk worden gegaan : versche varkensmagen worden fijngesneden, in vacuo gedroogd, met petroleum aether in een Soxhlet apparaat geëxtraheerd, in een luchtstroom van de petroleum aether bevrijd, tot fijn poeder gemalen (nr. 0,30) en weer even gedroogd.

Men verkrijgt hier ook zeer werkzame bereidingen wanneer de magen eerst aan een verteringsproces onderworpen worden.

Hiertoe gebruikt men maagsap van andere dieren (duif) en laat het autolyseproces doorgaan tot een gedeeltelijke vervloeing van de massa. Het vloeibare gedeelte bevat het antiperniciosa princiep, het wordt afgefiltreerd, ingedampt en gedroogd.
Naar Walden kan men versche en gereinigde varkensmagen fijnmalen, met zoutzuur op een pH van 4,5 à 5,0 instellen, 2 à 4 uur aan 40° laten staan, in vacuo aan 40° drogen en met petroleumaether ontvetten.

Lever- en maagpreparaten kan men ook samen combineeren en wel op zulke wijze dat men fijngemalen varkensmagen aan varkens- of kalflever vermengt en bij een pH van 3 à 6, gedurende verschillende uren bij 38° aan zelfvertering onderwerpt. De antipernicieuze werking schijnt hierdoor aanzienlijk te verhoogen.

--ooo--

ENKELE AANGERADEN BOEKEN EN TIJDSCH

Annual Reviews of Biochemistry.

C.SCHMIDT : The chemistry of the Amino Acids and

HARROW, SCHERWIN : Textbook of Biochemistry

M. FLORKIN & L. MASSART : Medische Biochemie.

M. FLORKIN : Biochimie générale.

R.A.GORTNER : Outlines of Biochemistry.

M.PIETTRE : Biochimie des proteines.

P. THOMAS : Manuel de Biochimie.

Exposés Annuels de Biochimie médicale, Parijs 1942.

M. POLONOWSKI : Elements de chimie médicale.

Symposium on Proteins. Amsterdam 1938.

Symposium on the physical chemistry of proteins.
Chemical Reviews vol. 24, N° 2, 1939, blz. 177

S.P. SORENSEN : Die konstitution der lösliche Proteïnstoffe.
Kolloid Zeitschrift 53, 1930 blz. 102, 170, 306.

TH. SVEDBERG : A discussion on the protein molecule. Proceedings Royal Soc. London 1939 vol 170 blz. 40.

D.CROWFOOT : The crystal structure of Insuline.
Proc. Roy. Soc. London 1938, vol. 164 blz. 580.

Forschritte der chemie organische naturstoffe 1, 2, 3 band (1938-1939)

NORD-WEIDENHAGEN : Handbuch der Enzymologie 1940.

Ergebnisse der Enzymforschung 1932 - 1943.

T. BERSIN : Kruzes Lehrbuch der Enzymologie.

L.F. FIESER : The chemistry of natural products related to phenanthrene.

H. SOBOTKA : The chemistry of the Sterids.

H. SOBOTKA : The physiological chemistry of the Bile.

H. LETTRE - INHOFFEN : Sterine, Gallensaure.

C. BOMSKOV : Methodik der Hormonforschung.

C. BOMSKOV : Methodik der Vitaminforschung.

F. GSTIRNER : Chemische vitamine Bestimmungsmethoden.

H. BREDERECK : Vitamine und Hormone und ihre technische Darstellung.

Fr. LEITZ : Darstellung von Vitaminpreparat

E. VINCKE : Darstellung von Hormonpreparaten.

K. RECKNAGEL : Wat de medicus practicus over v

L. RUZICKA, W. STEPP : Ergebnisse der Vitamin- u

R. AMMON & W. DIRSCHELL : Fermente - Hormone - Vi

RUDOLPH : Die Vitamine der Hefe.

STEPP,KUHNAN, SCHROEDER : Die Vitamine.

L. J. HARRIS : Vitamines.

HARROW, SCHERWIN : The chemistry of the Hormones.

Zeitschrift für Vitaminförschung.

VAN EEKELEN : Over opname, verbruik en uitscheiding van Vitamine C door de mens.

ZSENT - GYORGYI : The mechanism of biological oxydations.

EMMERIE : Bijdragen in Zeitschrift für Vitaminförschung en Recueil Trav. Chim. Pays-bas.

---ooo---

UNIVERSITY OF ILLINOIS-URBANA
543.4 R94B C001 v.2
Biologische geneesmiddelen proteinen f
3 0112 088432197